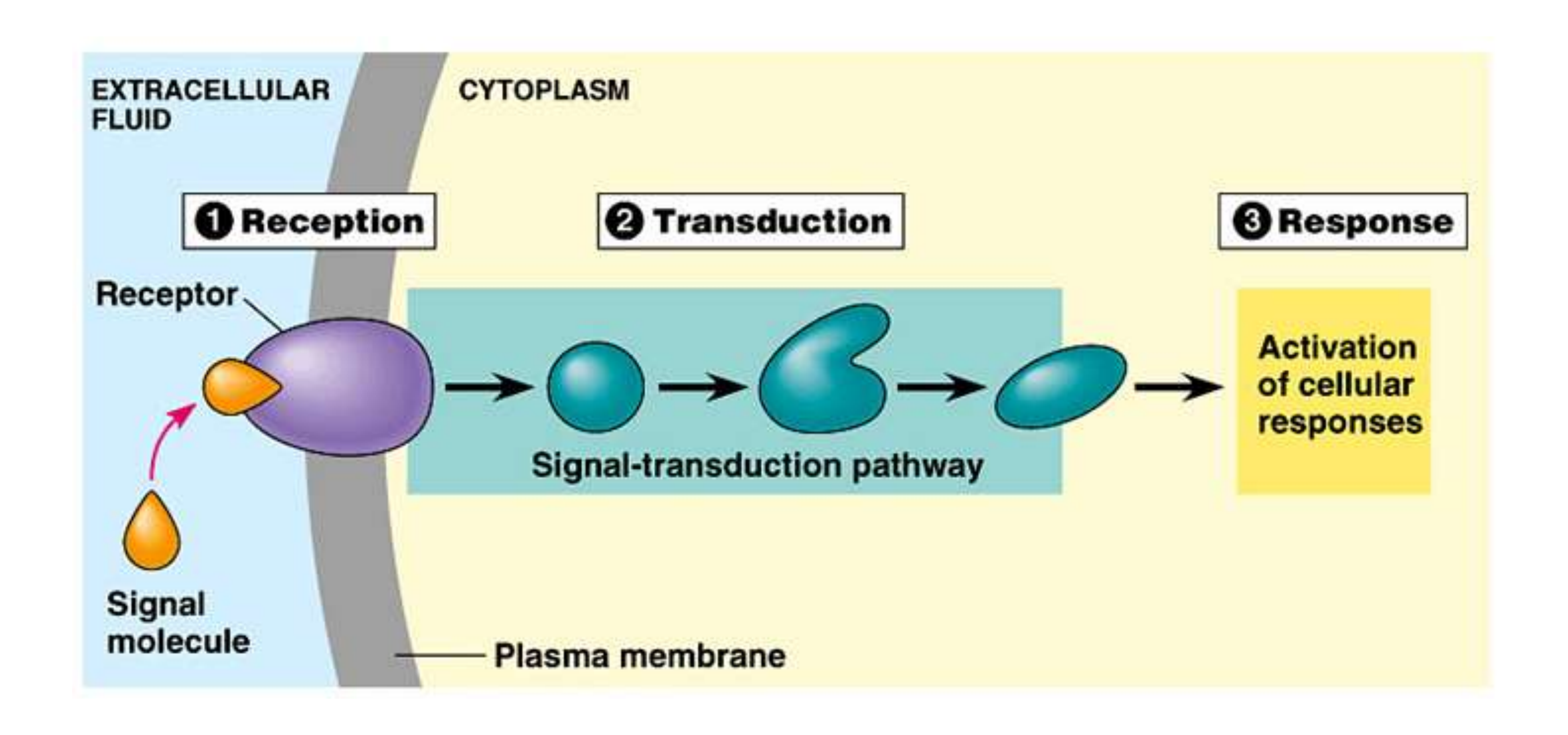
第6章 蛋白质分选与膜泡运输



第一节 细胞内蛋白质的分选

一、信号假说与蛋白质分选信号

细胞质的游离核糖体产生非分泌蛋白，

内质网附着核糖体产生分泌蛋白。

核糖体没有结构差异，假设差异存在于蛋白质本身，提出“信号假说”。

一、信号假说与蛋白质分选信号

- **信号假说：**分泌蛋白可能携带N端短信号序列，一旦该序列从核糖体翻译合成，结合因子和蛋白结合，指导其转移到内质网膜，后续翻译过程将在内质网膜上进行。
- 现在已知，信号假说是解释分泌性蛋白在糙面内质网上合成的重要理论，该过程是包括蛋白质N端的信号肽、信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)和内质网膜上信号识别颗粒的受体（又称停泊蛋白，docking protein，DP）等因子共同协助完成的。

（一）蛋白质转移到内质网合成涉及以下成分

①**信号肽**：信号肽位于蛋白质的N端，一般由16-26个氨基酸残基组成，其中包括信号肽疏水核心区、N端和C端3部分；原核细胞某些分泌性蛋白的N端也具有信号序列。

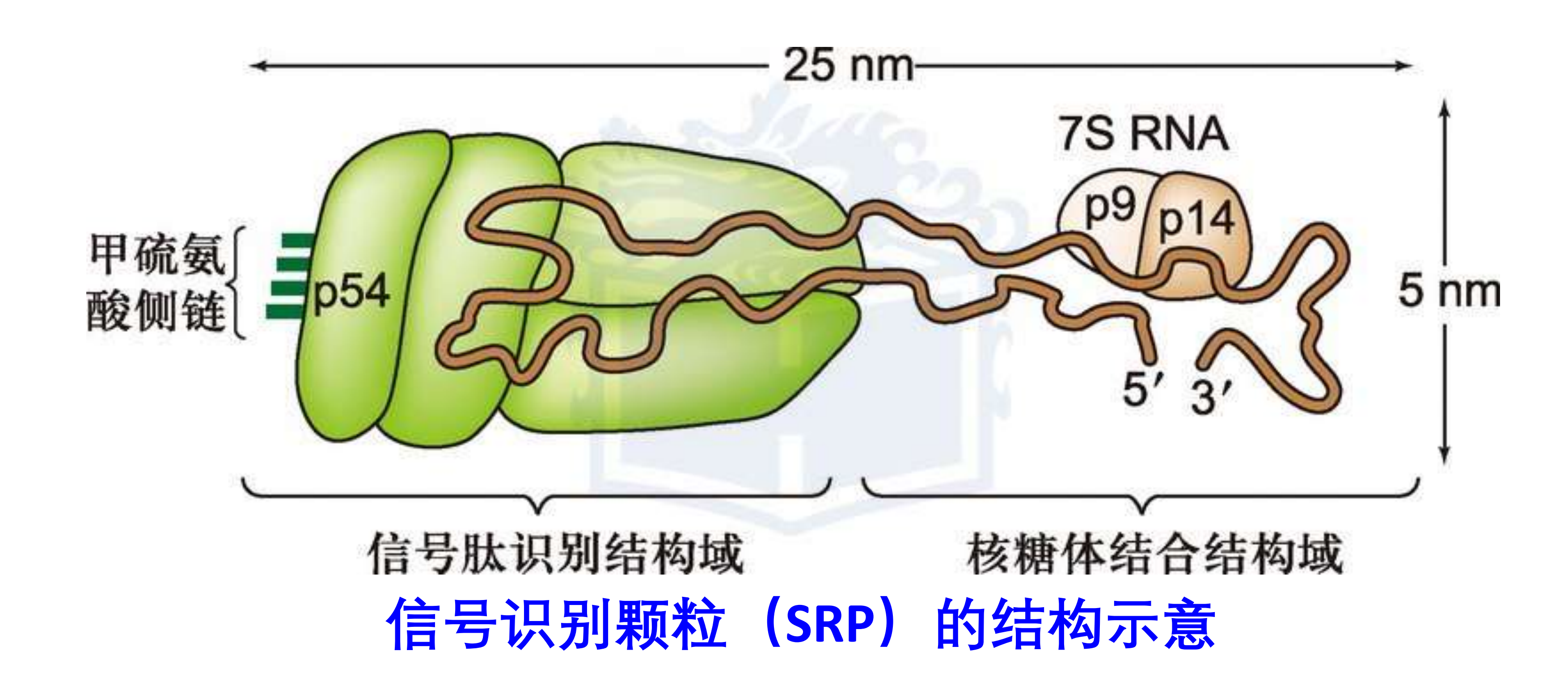
值得注意的是，信号肽似乎没有严格的专一性，如大鼠的胰岛素原蛋白接上真核或原核细胞的信号肽，均可通过大肠杆菌的细胞质膜分泌到细胞外。



信号肽的一级结构序列

②信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)：

- 一种核糖核蛋白复合体，含有2种结构域，即信号肽识别结构域和核糖体结合结构域，SRP既可与新生信号肽序列和核糖体大亚基结合，又可与内质网膜上SRP受体结合。
- SRP通常存在于细胞质基质中，等待信号肽从多核糖体上延伸暴露出来，当SRP与信号肽甲硫氨酸侧链与信号肽的疏水核心结合后，SRP的p9和p14蛋白复合体阻断新生肽链的翻译。指导新生多肽及核糖体和mRNA附着到内质网膜上。



信号识别颗粒（SRP）的结构示意

（一）蛋白质转移到内质网合成涉及以下成分

③**信号识别颗粒的受体**（又称停泊蛋白，DP），与SRP特异结合，存在于内质网膜上。

应用体外无细胞系统进行蛋白质合成实验，

证实分泌蛋白向rER 腔内的转运是同蛋白质翻译过程偶联进行的，

这种分泌蛋白在信号肽引导下边翻译边跨膜转运的过程称为共翻译转运。

- 可溶性蛋白的合成与转运过程
- 跨膜蛋白的合成与转运过程

1.可溶性蛋白的合成与转运过程

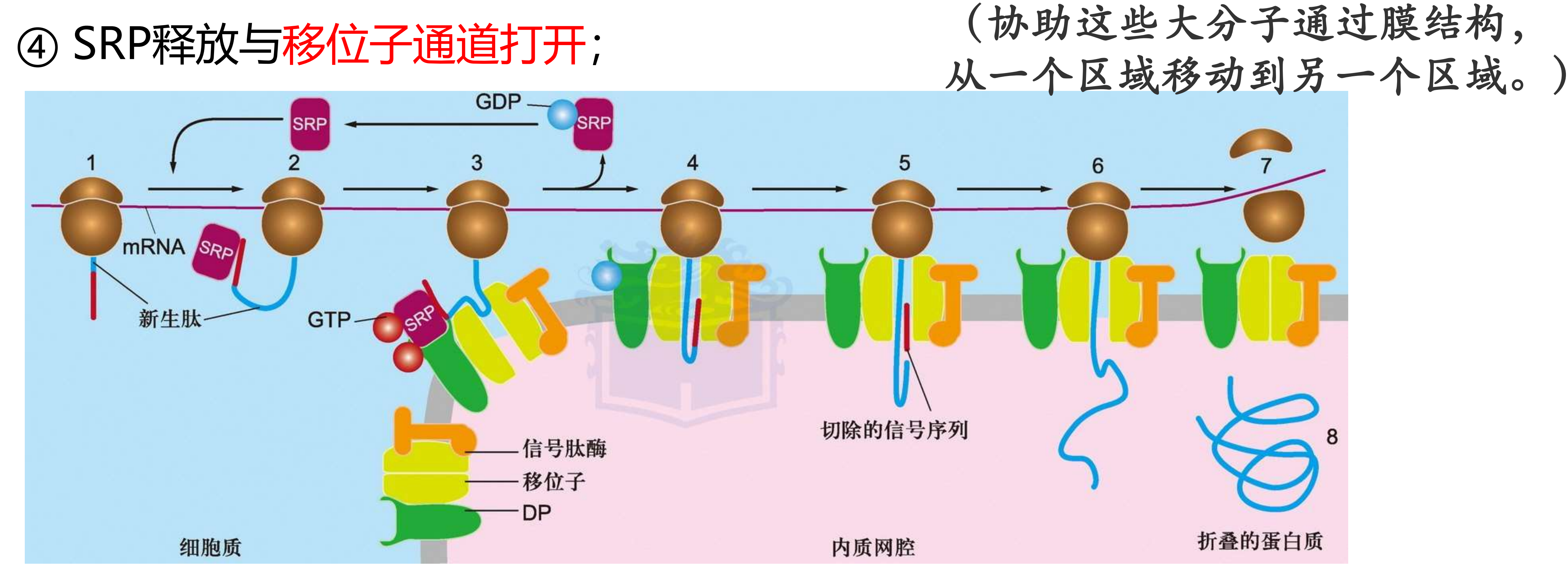
① 核糖体组装、细胞质中翻译起始，形成信号肽；

② 信号肽与SRP结合，肽链合成暂时停止；

③ SRP与受体结合，核糖体附着到内质网的移位子上；

④ SRP释放与移位子通道打开；

（协助这些大分子通过膜结构，从一个区域移动到另一个区域。）



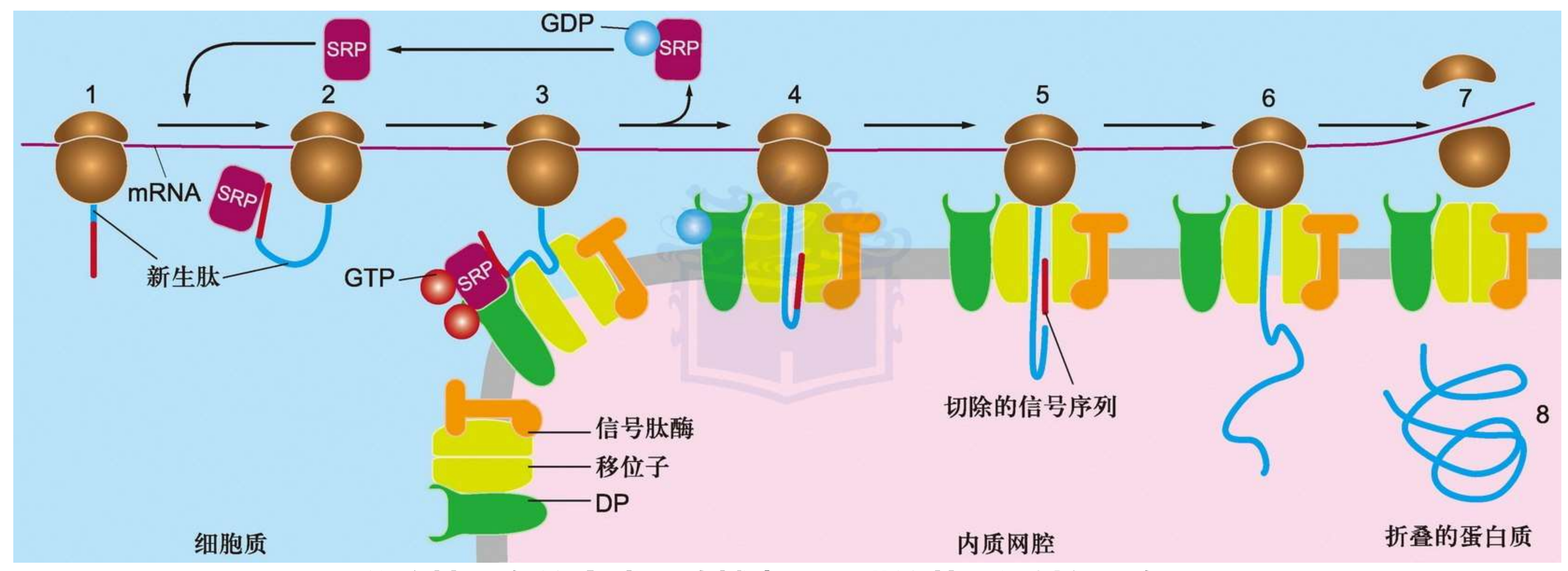
分泌性蛋白的合成与跨越内质网膜的共翻译转运图解

⑤ 信号肽被信号肽酶切除；

⑥ 肽链开始延伸并不断向内腔运输（**共转运**）；

⑦ 核糖体大小亚基解离，肽链延伸终止；

⑧ 释放合成的蛋白到内质网的腔，并完成蛋白折叠。



分泌性蛋白的合成与跨越内质网膜的共翻译转运图解

2.跨膜蛋白的合成与转运过程

转运特点：

①信号肽（开始转移序列）分 N端信号肽和内部信号肽（信号序列位于肽链内部）两种。

②停止转移锚定序列，即肽链上一段与内质网膜结合力很高的序列，在过内质网膜时，这段序列与双脂层结合后不再进入内质网腔，具有终止穿膜转运的作用。

如果一种多肽只有N端信号序列而没有停止转移锚定序列，这种多肽合成后一般进入内质网腔中；如果一种多肽的停止转移锚定序列位于多肽的内部，这种多肽最终会成为内质网膜的跨膜整合蛋白。

3.导肽与后翻译转运

线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的蛋白质也是在某种信号序列的指导下进入这些细胞器中。这种信号序列称为**导肽**，其基本的特征是蛋白质在细胞质基质中的游离核糖体上合成以后再转移到这些细胞器中，因此称这种翻译后再转运的方式为**后翻译转运**。

基本特征：

✓这种转运方式在蛋白质跨膜过程中**需要ATP，使多肽去折叠；**

✓**还需要一些蛋白质（分子伴侣）的帮助（如热休克蛋白Hsp70）使其能够正确地折叠成有功能的蛋白。**

继发现信号肽序列之后，人们又发现一系列蛋白质分选信号序列，统称**信号序列**，而且有些信号序列还可形成三维结构的**信号斑**，指导蛋白的靶向转运和定位。

表 8-2　指导蛋白质从细胞质基质转运到细胞器的靶向序列的主要特征*

靶细胞器	蛋白质中信号序列的定位	信号序列是否切除	信号序列性质
内质网	N 端	切除	6~12 个疏水氨基酸核心，前面常有一个或多个碱性氨基酸（Arg、Lys）
线粒体（基质）	N 端	切除	两性螺旋，长度 20~50 个氨基酸残基，一侧具有 Arg 和 Lys 残基，另一侧是疏水残基
叶绿体（基质）	N 端	切除	没有共同基序，常富含 Ser、Thr 和少数疏水残基，罕见 Glu 和 Asp
过氧化物酶体	大多在 C 端 少数在 N 端	不被切除	PTS1 信号（Ser–Lys–Leu）在 C 端，PTS2 信号在 N 端
细胞核	变化的	不被切除	多种类型，共同基序含有短的富含 Lys 和 Arg 残基序列

*靶向细胞器的膜或其他亚区间的蛋白有不同或附加的信号序列。

（三）蛋白质的分选信号

1.信号序列：引导蛋白质定向转移的线性序列，通常15-60个氨基酸残基，对所引导的蛋白质没有特异性要求。

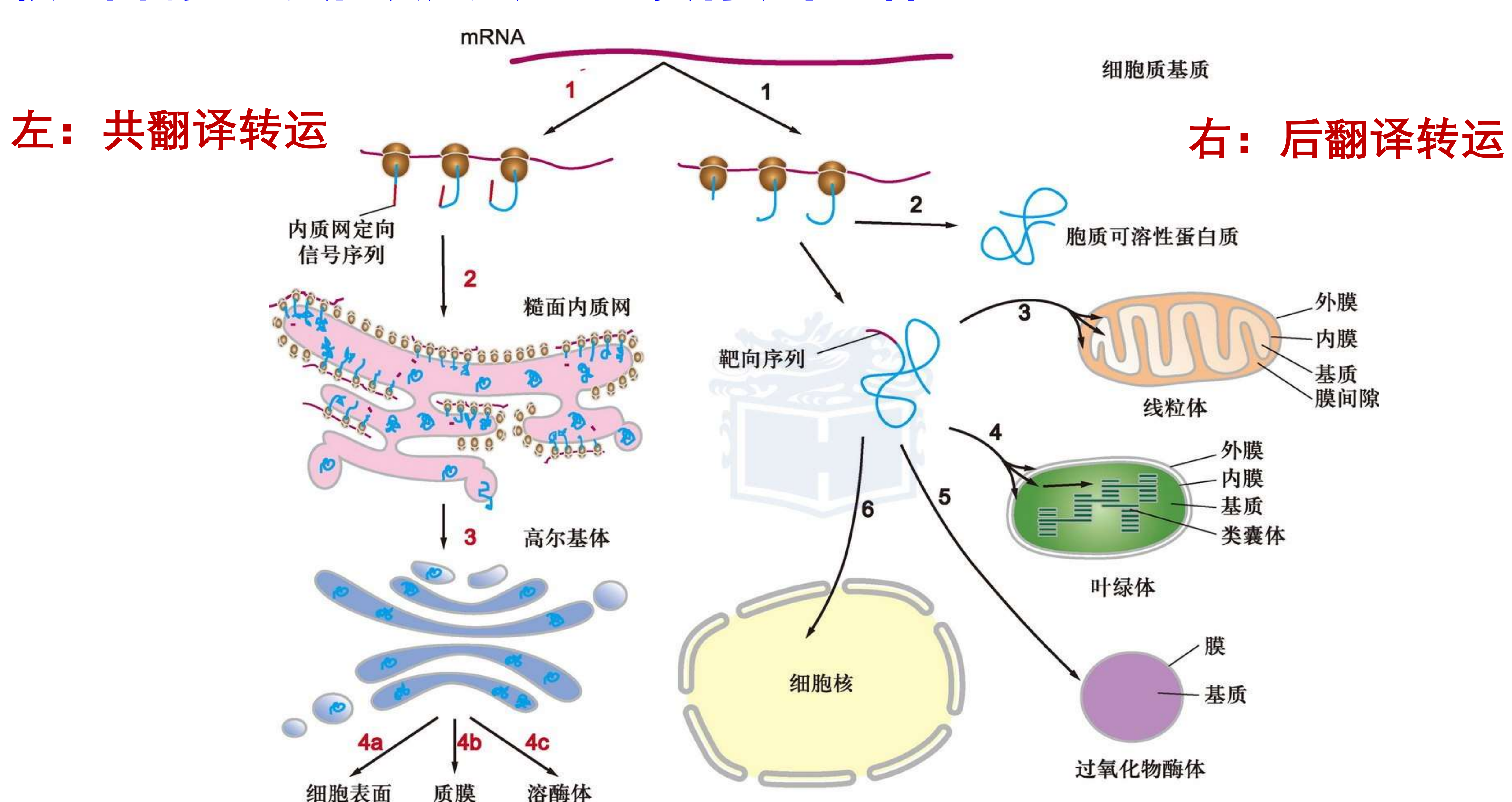
2.信号斑：存在于完成折叠的蛋白质中，构成信号斑的信号序列之间可以不相邻，折叠在一起构成蛋白质分选的信号。

二、蛋白质分选转运的基本途径与类型

核基因编码的蛋白质分选途径主要有以下两种：

左：共翻译转运

右：后翻译转运



根据蛋白质分选的机制或转运方式不同，又可将蛋白质转运分为4类：

（1）跨膜转运：指共翻译转运途径中蛋白质边合成边转运进入内质网腔或插入内质网膜；另后指翻译转运途径中蛋白质在合成后依不同机制转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器。

（2）膜泡运输：蛋白质被不同类型的转运膜泡从糙面内质网合成部位转运至高尔基体进而再分选转移至细胞的不同部位，其中涉及供体膜出芽形成不同的转运膜泡、膜泡运输和转运膜泡与靶膜的融合等过程。

根据蛋白质分选的机制或转运方式不同，又可将蛋白质转运分为4类：

（3）选择性门控转运：在游离核糖体上合成的蛋白质通过核孔复合体在核-质间双向选择性地完成核输入或核输出。

（4）细胞质基质中蛋白质的转运：蛋白质在细胞质基质中的转运与细胞骨架系统密切相关，其它不明。

三、蛋白质向线粒体、叶绿体和过氧化酶体的分选

转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器的蛋白质分选是一个**多步过程**，需要多个不同的**靶向序列**。

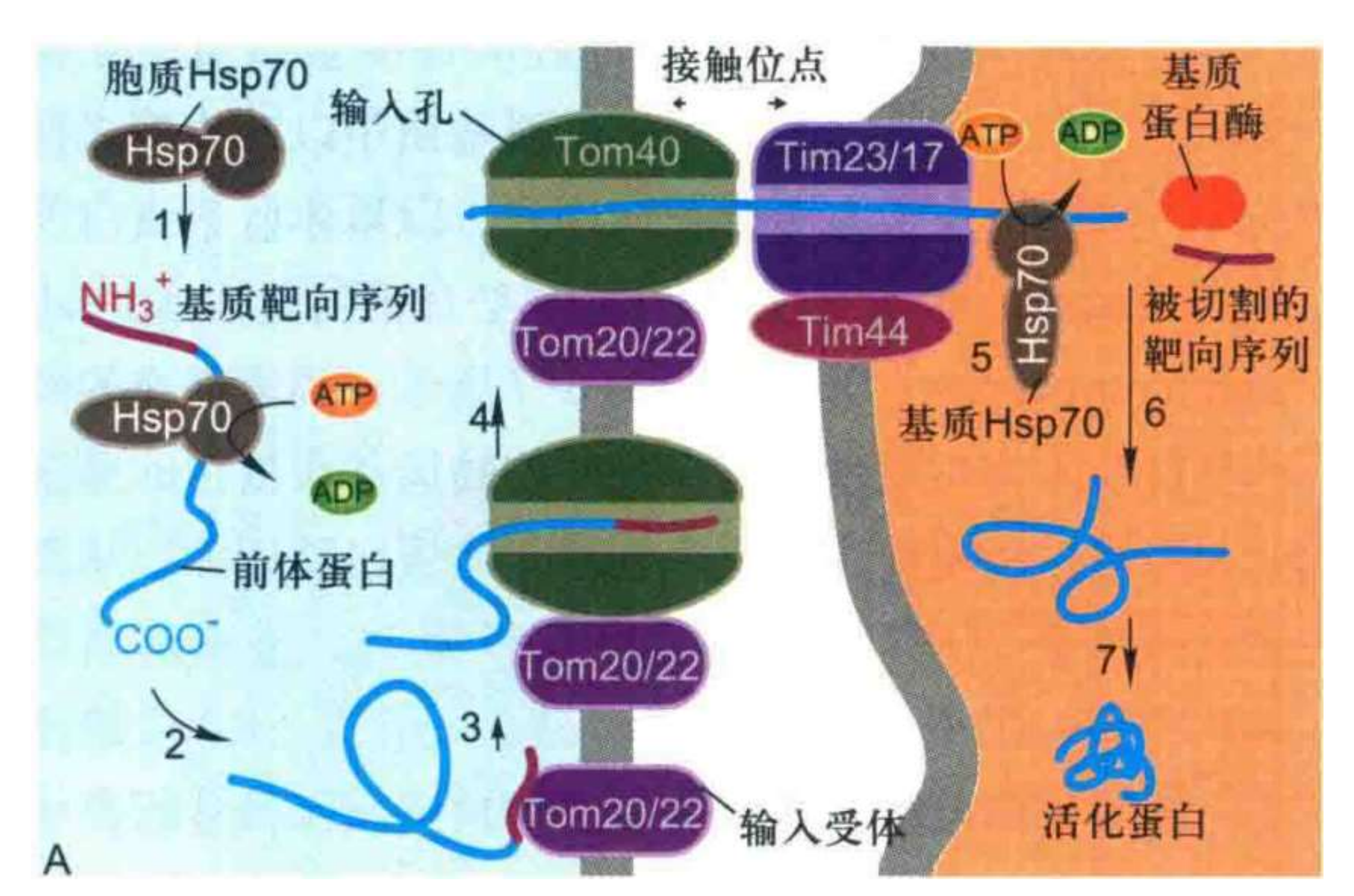
(1)定位到叶绿体的前体蛋白**N端**具有40-50个氨基酸组成的**转运肽**，用以指引多肽定位到叶绿体并进一步穿过叶绿体被膜进入基质或类囊体中。

(2)转运到线粒体和过氧化物酶体的蛋白质靠的是线粒体蛋白**N端的导肽**或过氧化物酶体蛋白**C端的靶向序列**。

（一）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体

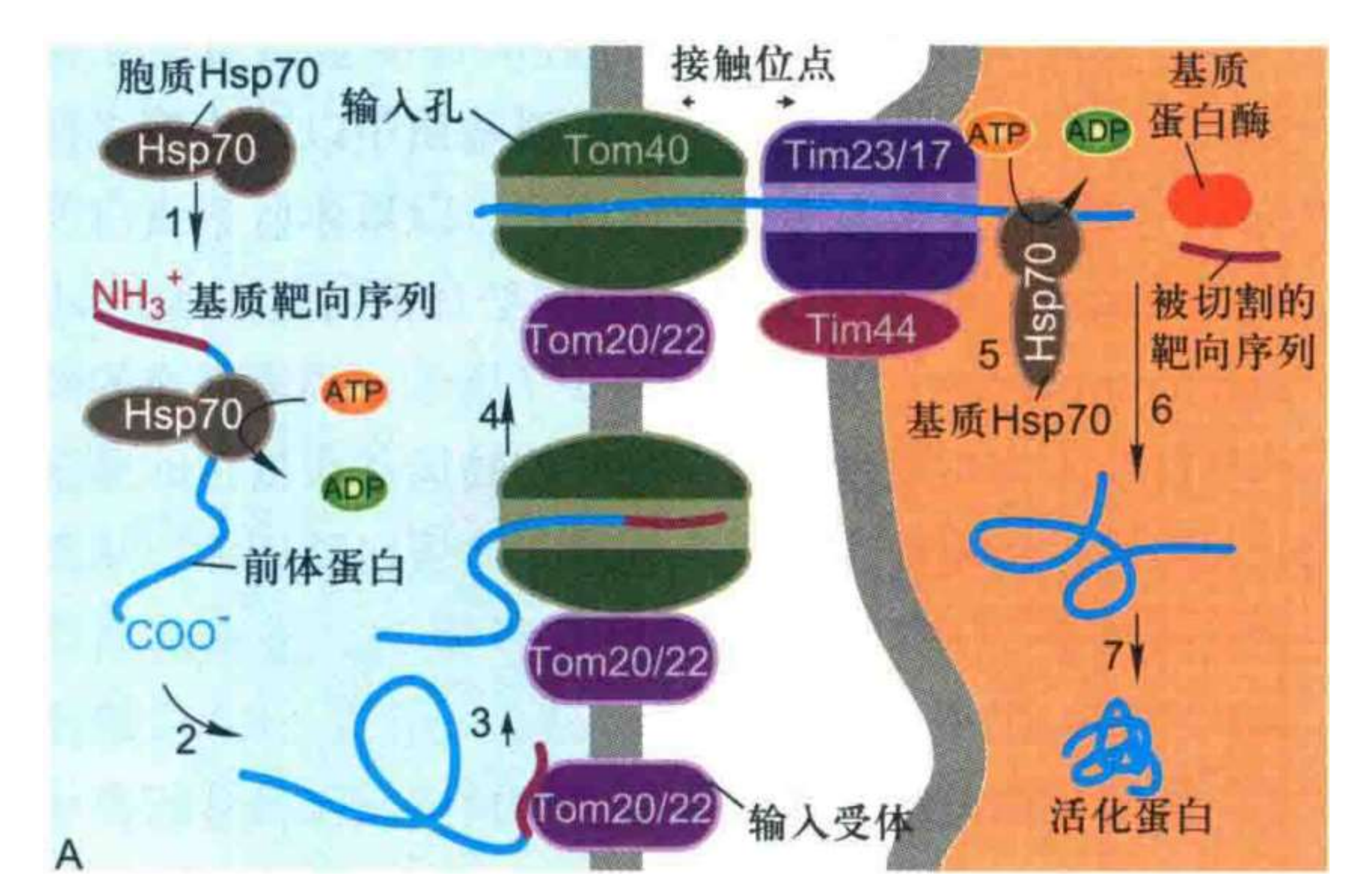
（1）游离核糖体上合成的前体蛋白与胞质蛋白分子伴侣Hsp70结合，保持未折叠状态，N端具有基质靶向序列

（2，3）前体蛋白与内外膜接触点附近的输入受体（Tom20/22)结合，被转运进入输入孔



（一）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体

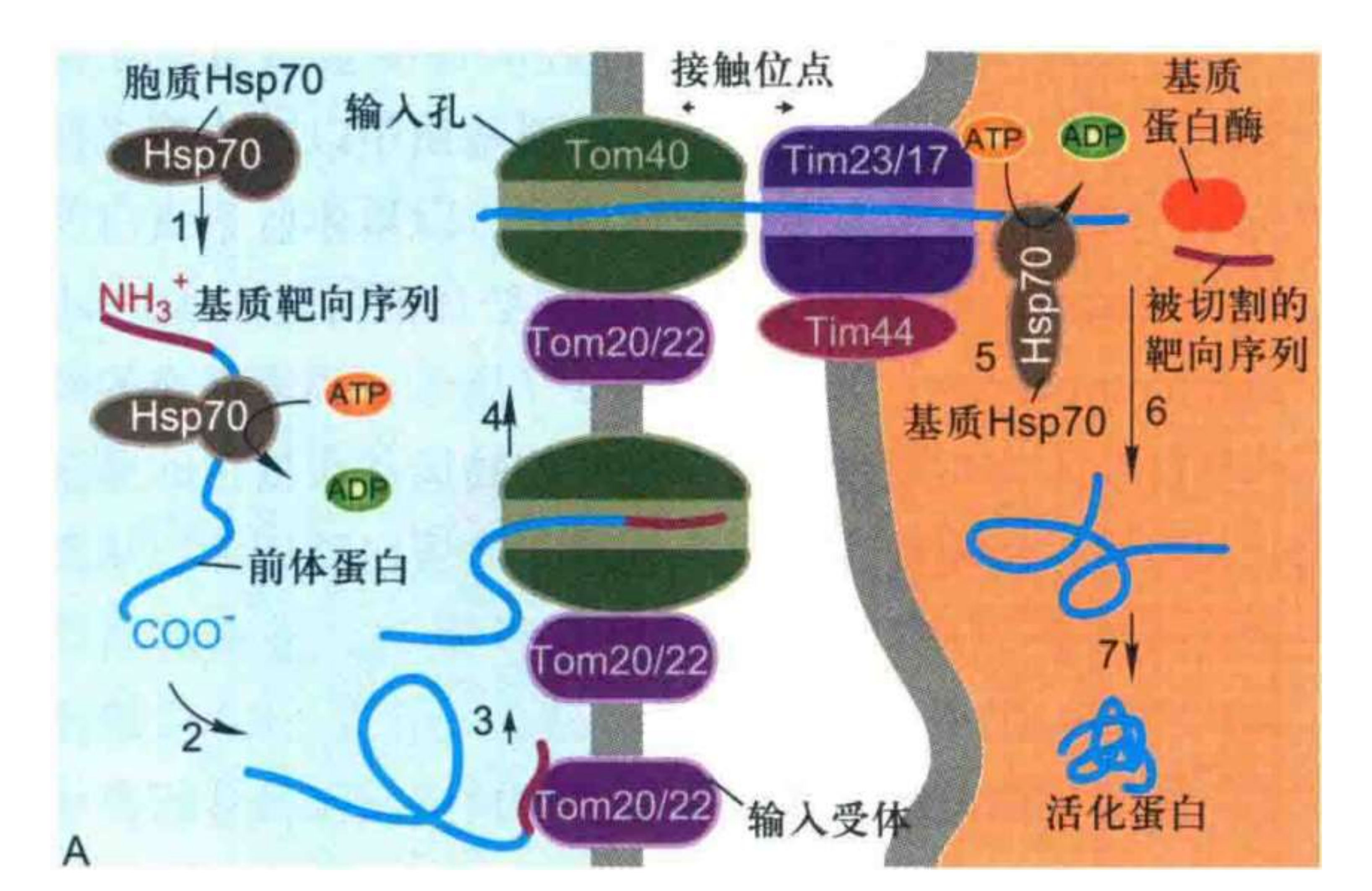
（4，5）输入的蛋白进而通过内外膜接触点的输入通道，线粒体基质分子伴侣Hsp70与输入蛋白结合并水解ATP以驱动机制蛋白的输入。



（一）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体

（6）输入的基质蛋白的靶向序列，在基质蛋白酶作用下被切除

（7）Hsp70也从基质蛋白上是释放出来，进而折叠，产生活性构象



（一）蛋白质从细胞质基质输入到线粒体

- 需要导肽
- 需要输入受体
- 从内、外膜接触点进入（输入孔道）
- 基质蛋白酶水解基质靶向序列
- 蛋白质解折叠、重新折叠需要分子伴侣（Hsc70）的帮助
- 需要能量

（二）叶绿体基质蛋白与类囊体蛋白的靶向输入

向叶绿体基质靶向运输过程和线粒体基质蛋白的输入基本相似：

叶绿体前体蛋白具有N端叶绿体（基质）靶向序列，如前体蛋白以非折叠形式输入，依赖于基质Hsp70水解ATP提供能量。

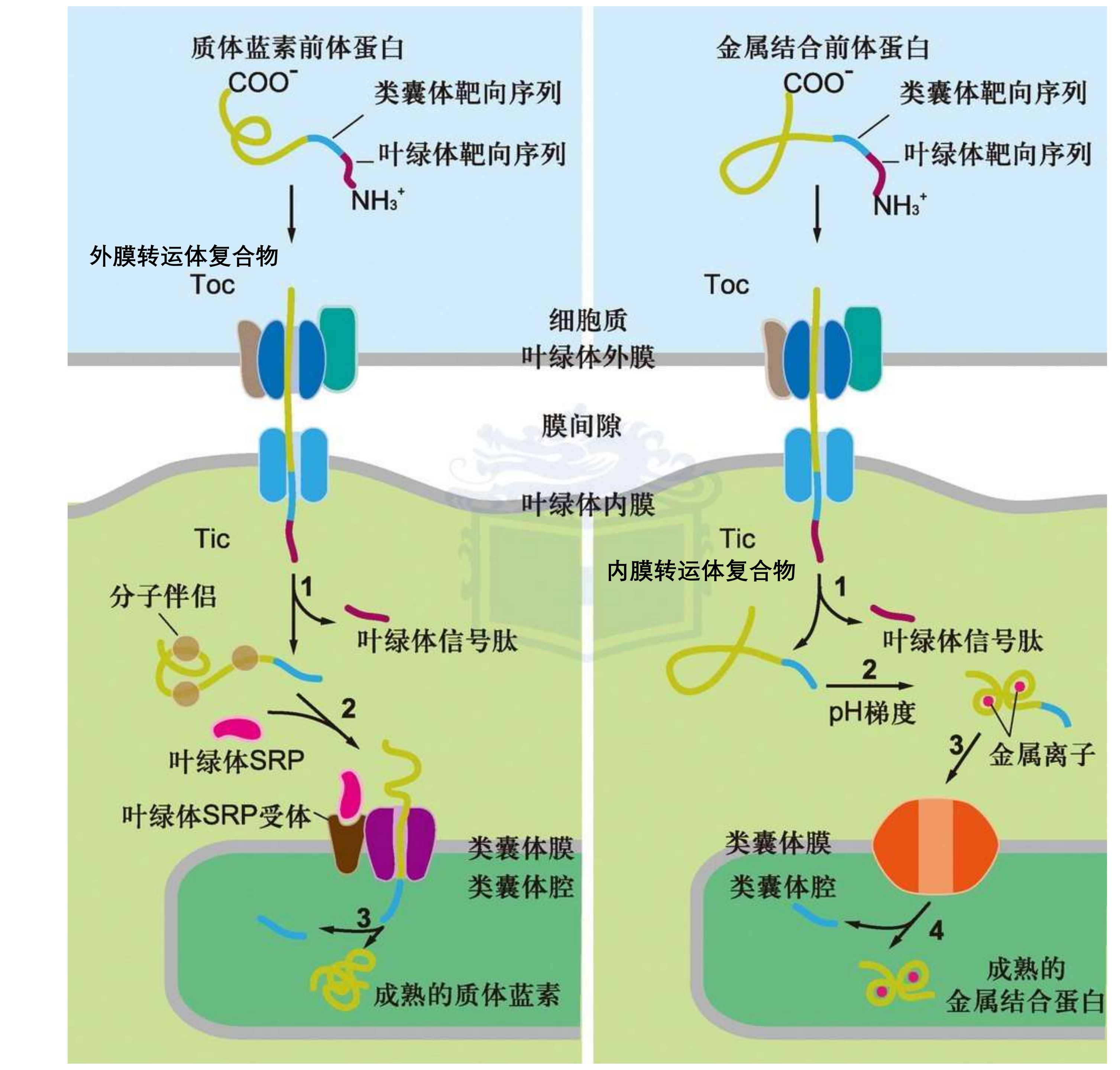
➢但与线粒体不同的是：

不产生跨内膜的电化学梯度（线粒体内有H^+泵），ATP水解功能是唯一动力来源。

（二）叶绿体基质蛋白与类囊体蛋白的靶向输入

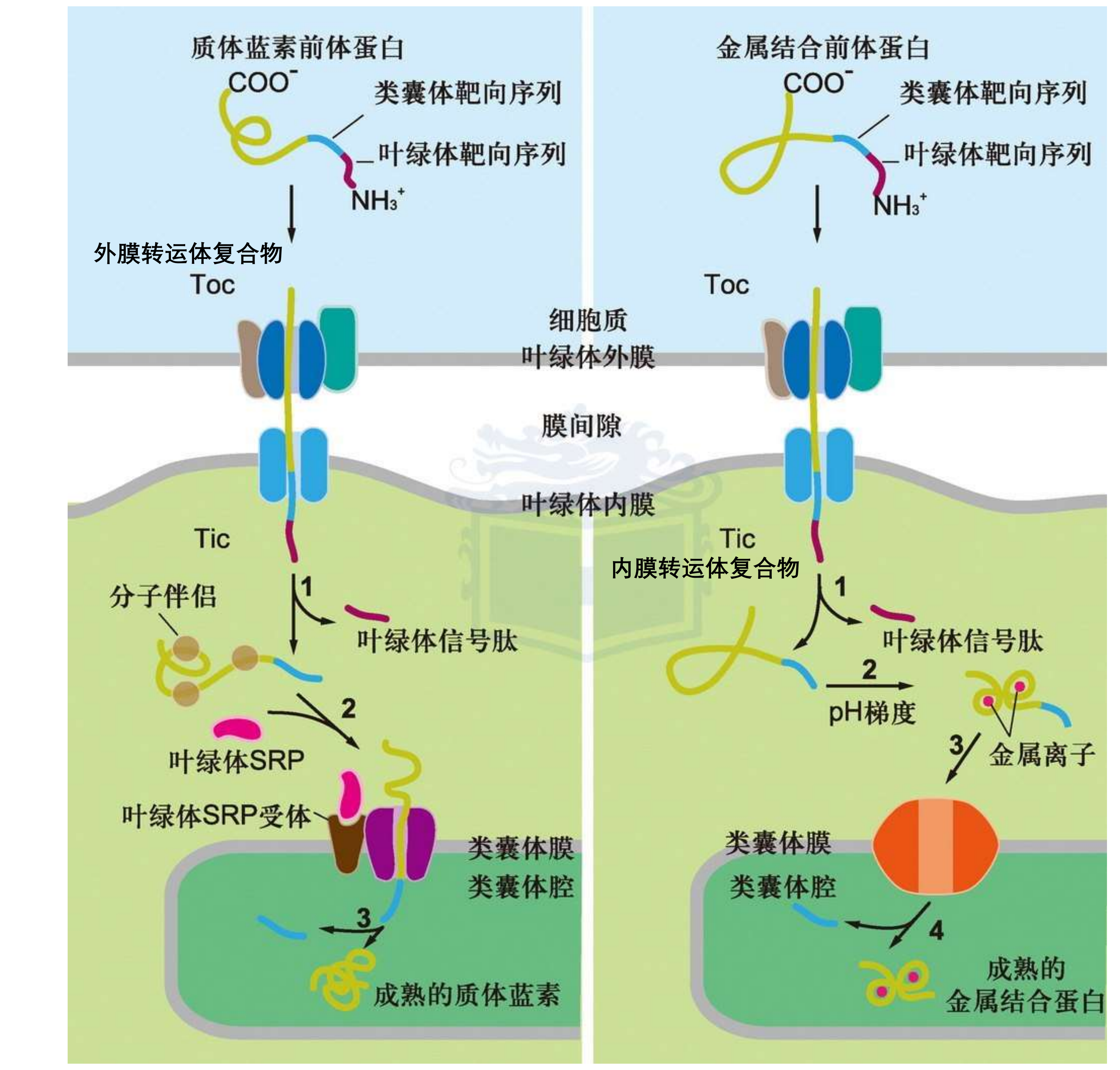
定位在类囊体膜和类囊体腔的蛋白在细胞质基质中以前体形式合成，含多个靶向序列。

尚未折叠的质体蓝素前体蛋白（光反应中流动的电子传递体）和金属结合前体蛋白通过**外膜上相同的转运基质蛋白通道进入基质，N端靶向序列被基质蛋白酶切除，类囊体靶向序列暴露**，进入基质后不同蛋白的转运途径不同：



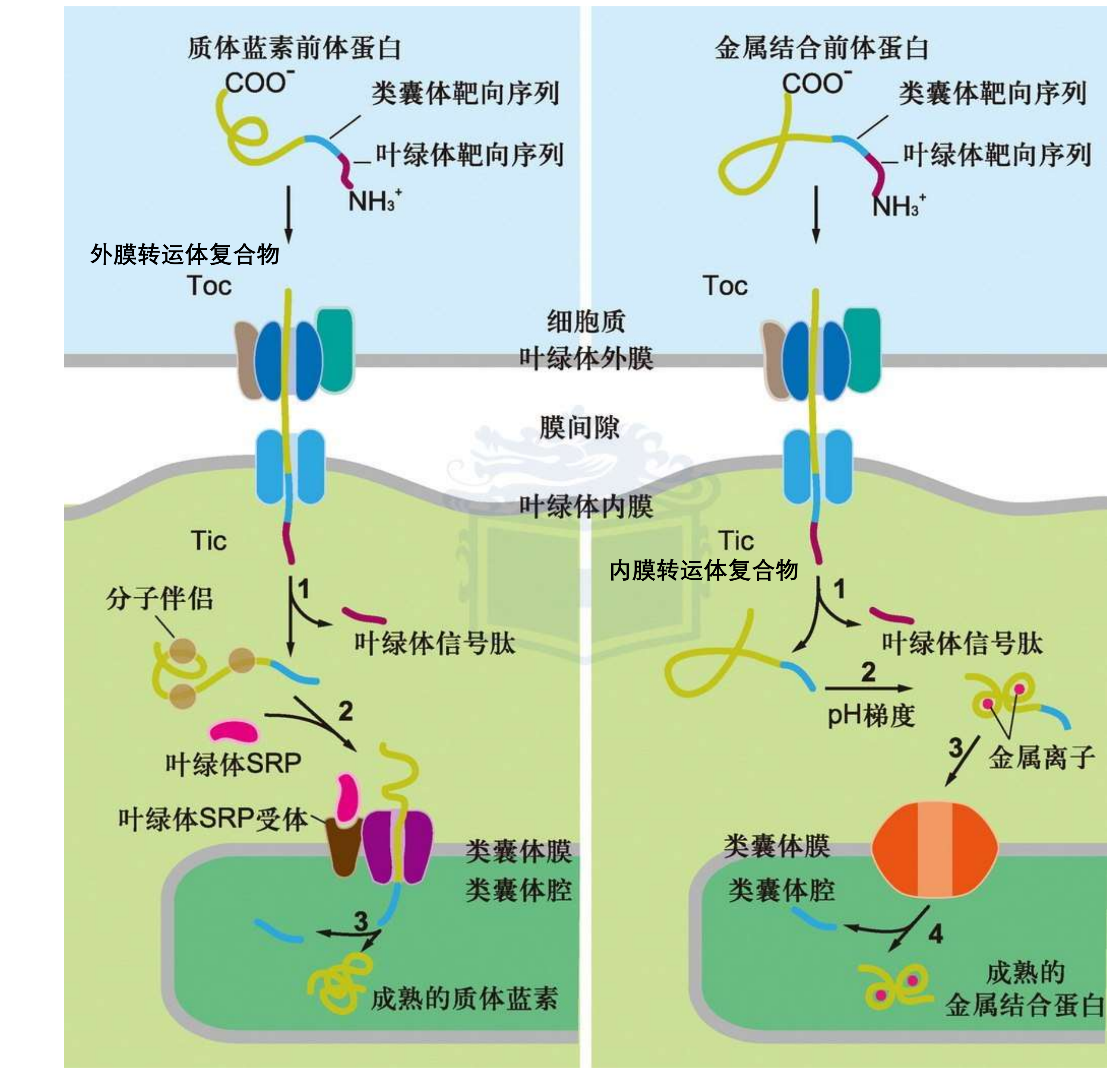
1.叶绿体SRP依赖途径

质体蓝素蛋白和类似蛋白在基质空间保持非折叠状态（需分子伴侣参与），在类囊体靶向序列指导下与叶绿体SRP结合，在类囊体膜上叶绿体SRP受体和转运蛋白SecY的介导下，转运到类囊体腔，类囊体靶向序列被内切蛋白酶切除，蛋白质折叠产生成熟构象。



2.pH依赖途径

非折叠的金属结合蛋白的N端基质靶向序列首先被切除，金属结合蛋白折叠并与辅助因子结合，类囊体靶向序列N端的<u>两个精氨酸残基</u>和<u>跨叶绿体内膜的pH梯度</u>是折叠蛋白输入到类囊体腔所必需的。输入到类囊体腔的金属结合蛋白N端的类囊体靶向序列被切除，产生成熟的构象。

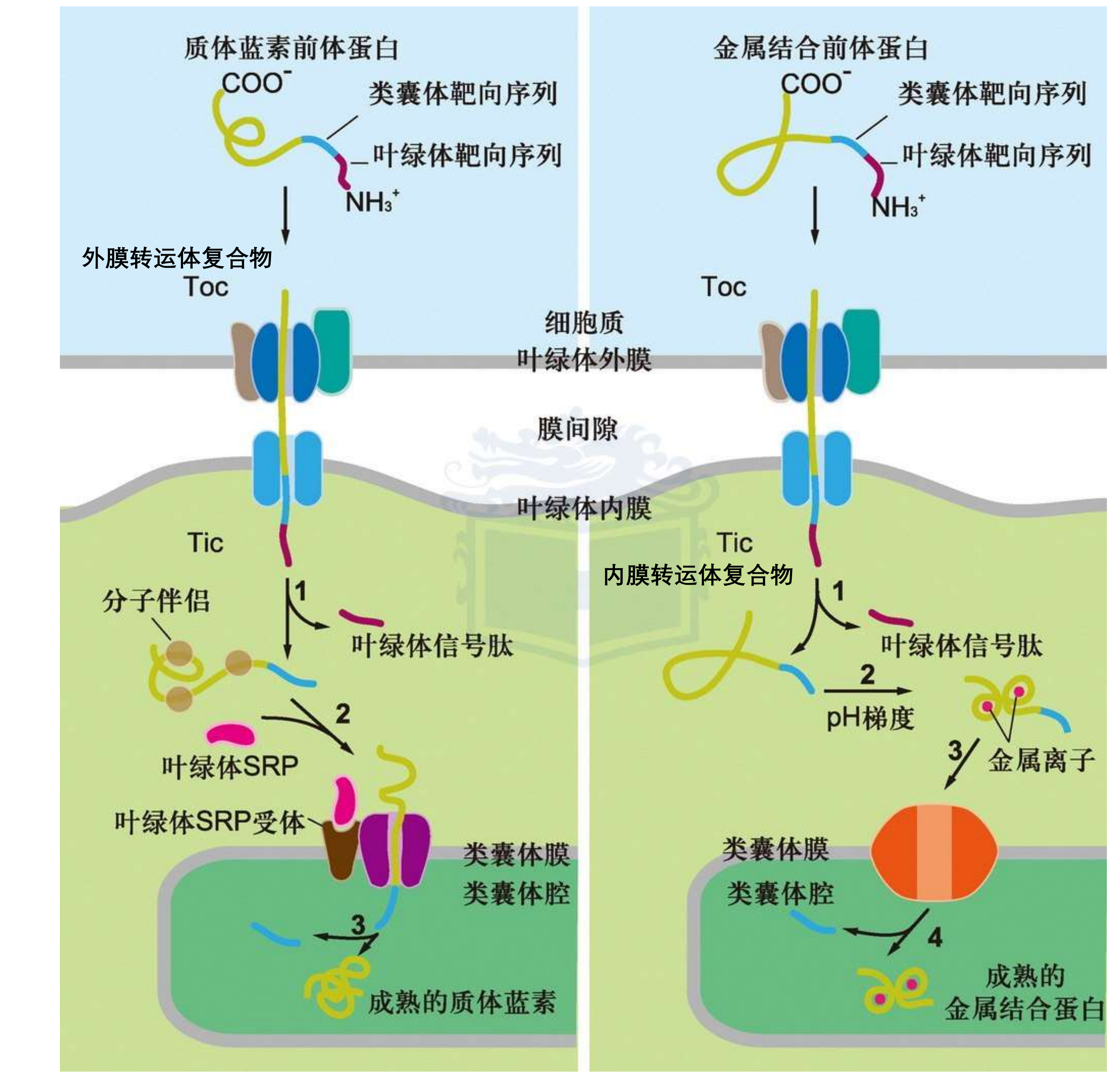


（二）叶绿体基质蛋白与类囊体蛋白的靶向输入

定位在类囊体膜和类囊体腔的蛋白在细胞质基质中以前体形式合成，含多个靶向序列。

1.叶绿体SRP依赖途径

2.pH依赖途径



第二节　细胞内膜泡运输

一、膜泡运输概述

二、COPⅡ包被膜泡的装配与运输

三、COPⅠ包被膜泡的装配与运输

四、网格蛋白／接头蛋白包被膜泡的装配与运输

五、转运膜泡与靶膜的锚定和融合

一、膜泡运输概述

膜泡运输是蛋白运输的一种特有的方式，普遍存在于真核细胞中。在转运过程中不仅涉及蛋白本身的修饰、加工和组装，还涉及到多种不同膜泡定向运输及其复杂的调控过程。

在细胞分泌与胞吞过程中，以膜泡运输方式介导的蛋白质分选途径形成细胞内复杂的膜流。这种膜流具有高度组织性、方向性并维持动态平衡。

细胞内复杂的膜流：

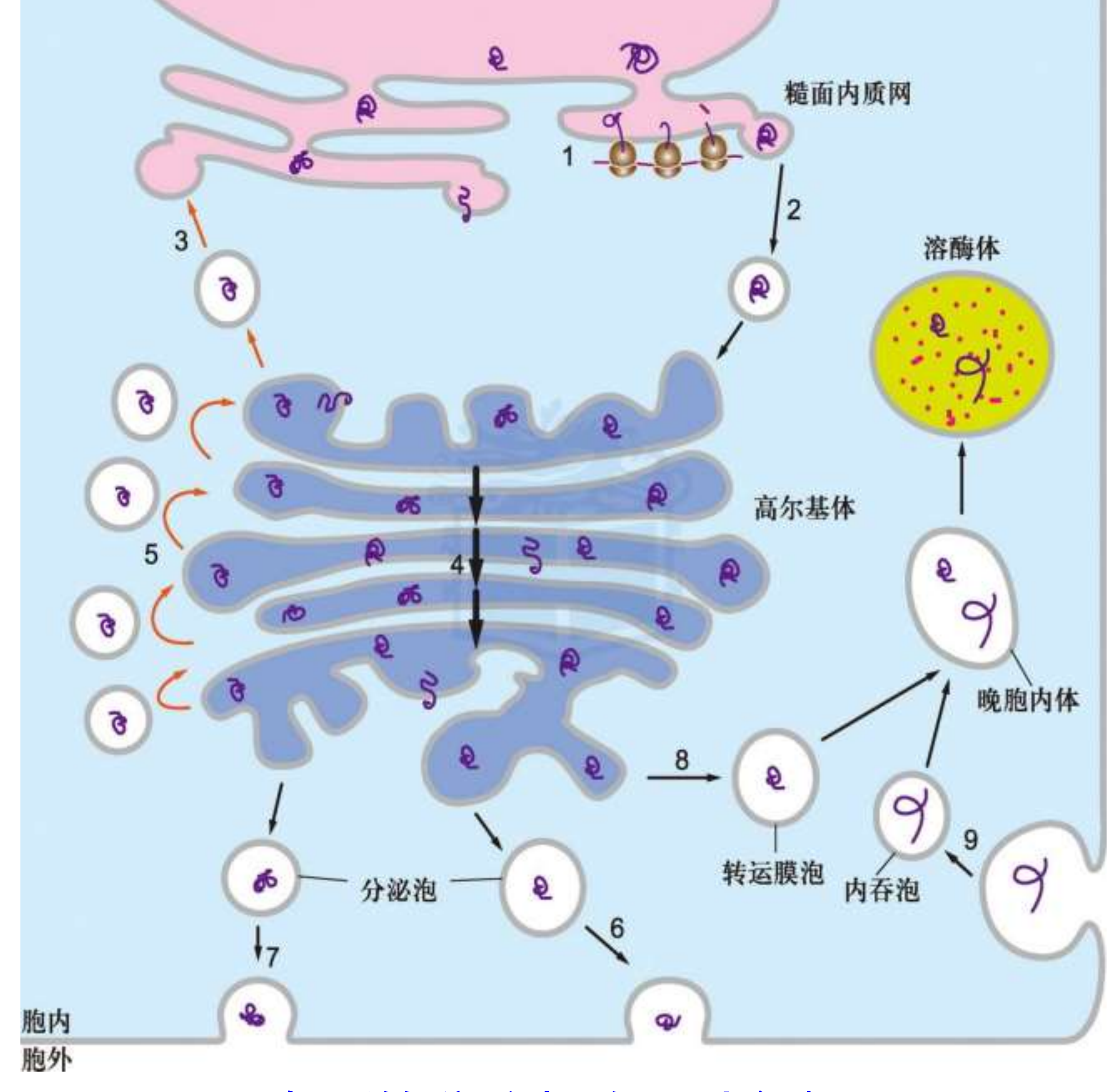
1、蛋白质在rER合成，通过共翻译转运途径跨膜运输。

2、内质网出芽，形成转运膜泡并与高尔基体融合，形成高尔基体顺面网状结构。

3、从高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构到rER的逆向运输。

4、高尔基体膜囊从顺面至反面成熟递进（非膜泡过程）。

5、从高尔基体后期膜囊到早期膜囊的逆向运输。



蛋白质的分泌与胞吞途径概观

细胞内复杂的膜流：

6、组成型分泌

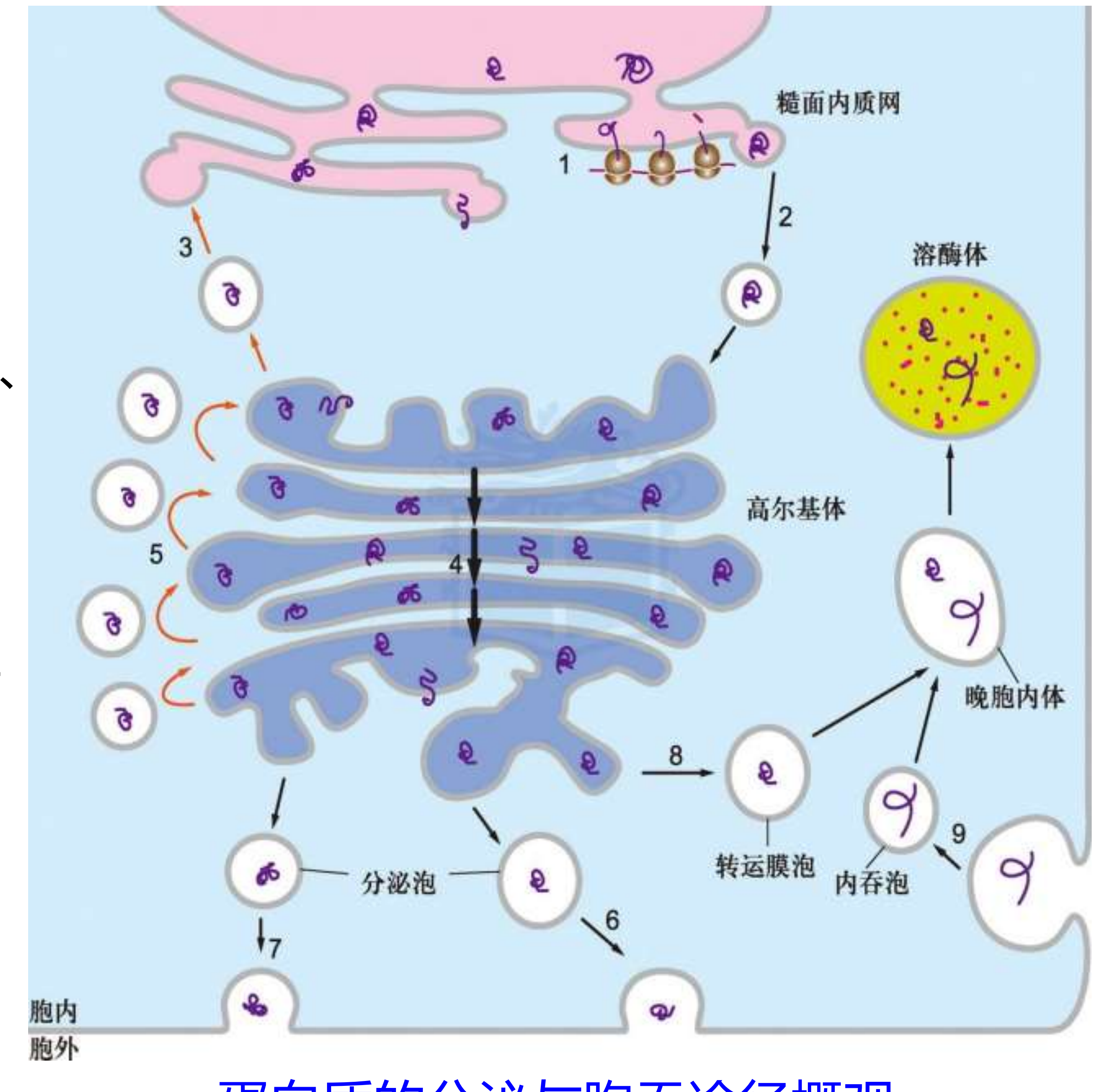
不需要分选信号， 从内质网经高尔基体到细胞表面的物质运输是自动地进行的。组成型分泌途径除了给细胞外提供酶、生长因子和细胞外基质成分外，也为细胞质膜提供膜整合蛋白和膜脂。

7、调节型分泌（诱导型分泌）

分泌小泡成群地聚集在质膜下，只有在外部信号的触发下，质膜产生胞内信使后才和质膜融合，分泌内容物。

8、分选到溶酶体

9、胞吞途径：从细胞表面到溶酶体的运输途径



蛋白质的分泌与胞吞途径概观

在细胞的膜泡运输中：

- 糙面内质网相当于重要的物质供应站，内质网驻留蛋白的驻留信号使得这类蛋白免于逃逸，故内质网又被称为“开放的监狱”。
- 高尔基体是重要集散中心，主要聚集在微管组织中心附近，在细胞的膜泡运输及其随之而形成的膜流中起枢纽作用。推测高尔基体极性的维持是由于在高尔基体膜囊上结合有类似动力蛋白的蛋白质。

细胞内膜泡运输需要多种转运膜泡参与，根据转运膜泡表面包被蛋白的不同，主要分3种不同类型，它们分别介导不同的膜泡转运途径：

（1）网格蛋白/接头蛋白包被膜泡

（2）COPⅡ（包被蛋白Ⅱ）包被膜泡

（3）COPⅠ（包被蛋白Ⅰ）包被膜泡

表 8-3 蛋白质转运中涉及的 3 种包被膜泡的特征比较

膜泡类型	介导的转运途径	包被蛋白	结合的 GTP 酶
COPⅡ包被膜泡	ER→高尔基体顺面膜囊	Sec23/Sec24 和 Sec13/Sec31 复合体，Sec16	Sar1
COPⅠ包被膜泡	高尔基体顺面膜囊→ER， 晚期高尔基扁平囊→早期扁平囊	包含 7 种不同 COP 亚基的包被蛋白	ARF
网格蛋白 / 接头蛋白包被膜泡	高尔基体反面膜囊→胞内体 高尔基体反面膜囊→胞内体 细胞膜→胞内体* 高尔基体→溶酶体， 黑（色）素体或血小板囊泡	clathrin / AP1 clathrin / GGA clathrin / AP2 AP3 复合物**	ARF ARF 证据表明不需 ARF ARF

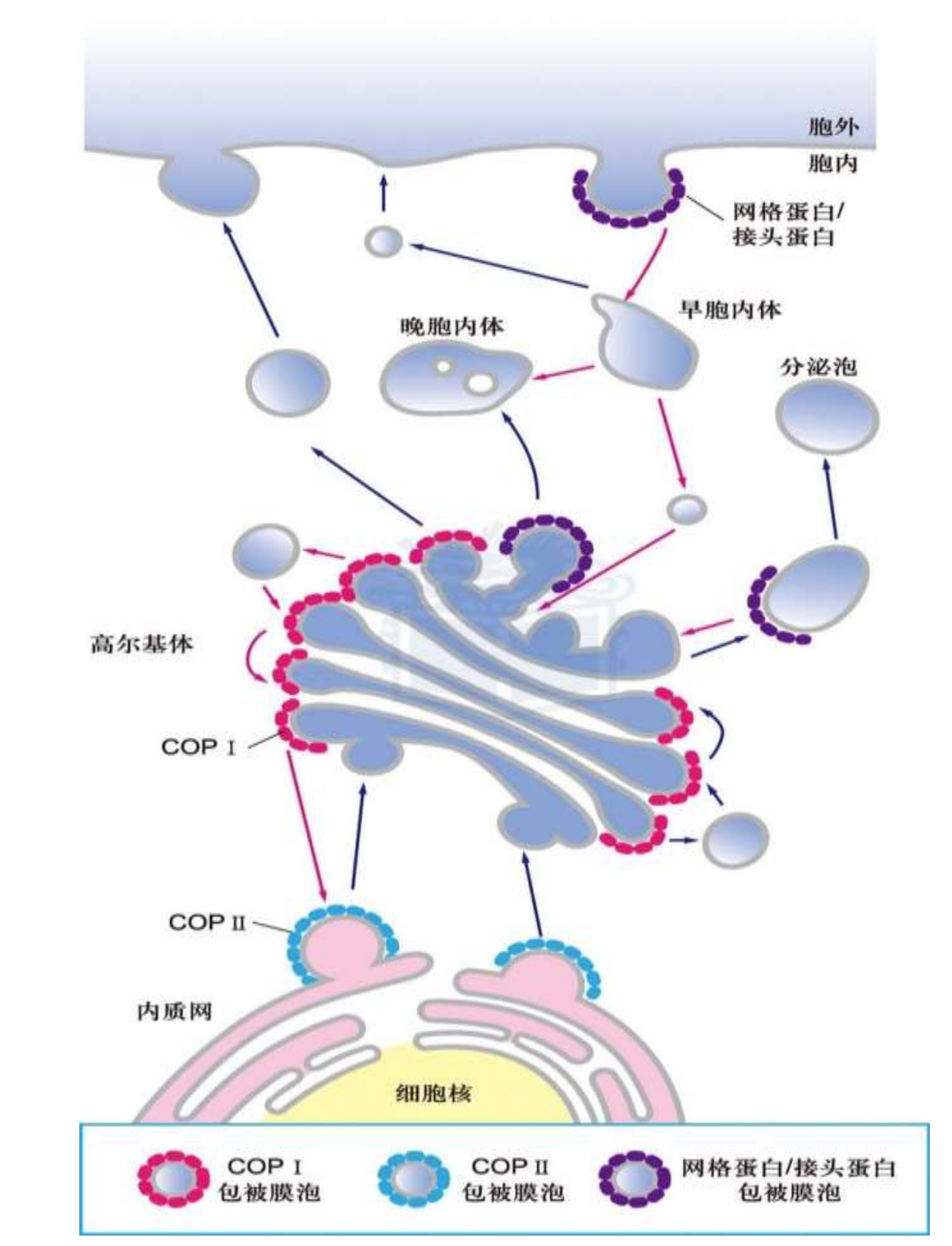
* 新近证据表明，在胞吞作用过程中，不需要 ARF 参与。** 每种类型 AP 复合物由 4 种不同亚基组成。AP3 复合物包被蛋白是否含有网格蛋白未知。

3种不同的主要膜泡运转途径

1、COPⅡ包被膜泡介导**顺向运输**，即从rER到高尔基体顺面网状结构

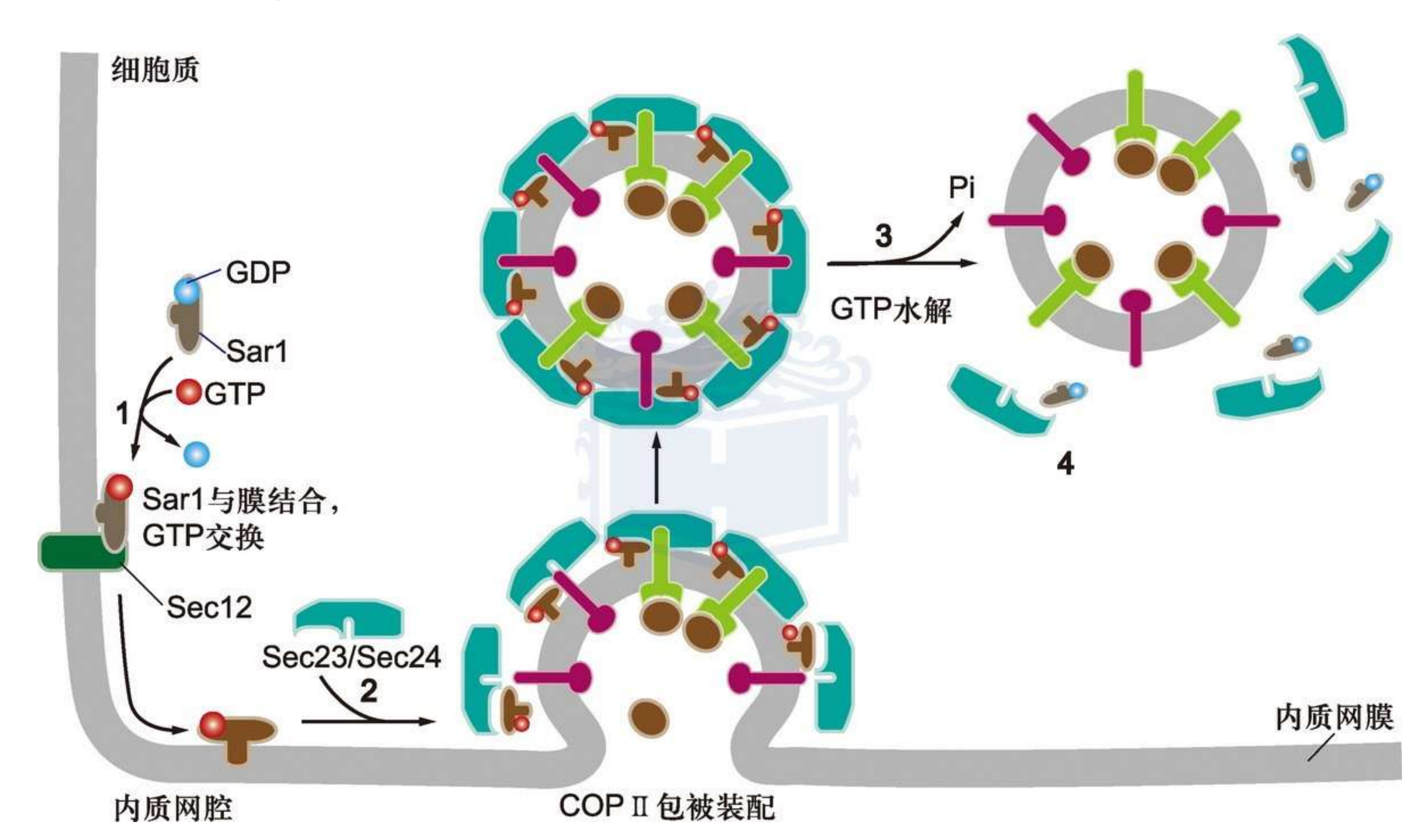
2、COPⅠ包被膜泡介导**逆向运输**，即在高尔基体内膜囊间和从高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构到rER

3、网格蛋白/接头蛋白包被膜泡**从高尔基体反面管网区出芽**和从**质膜内化**形成，脱包被后与晚期胞内体融合，此类膜泡的包被除网格蛋白外还有其他蛋白。

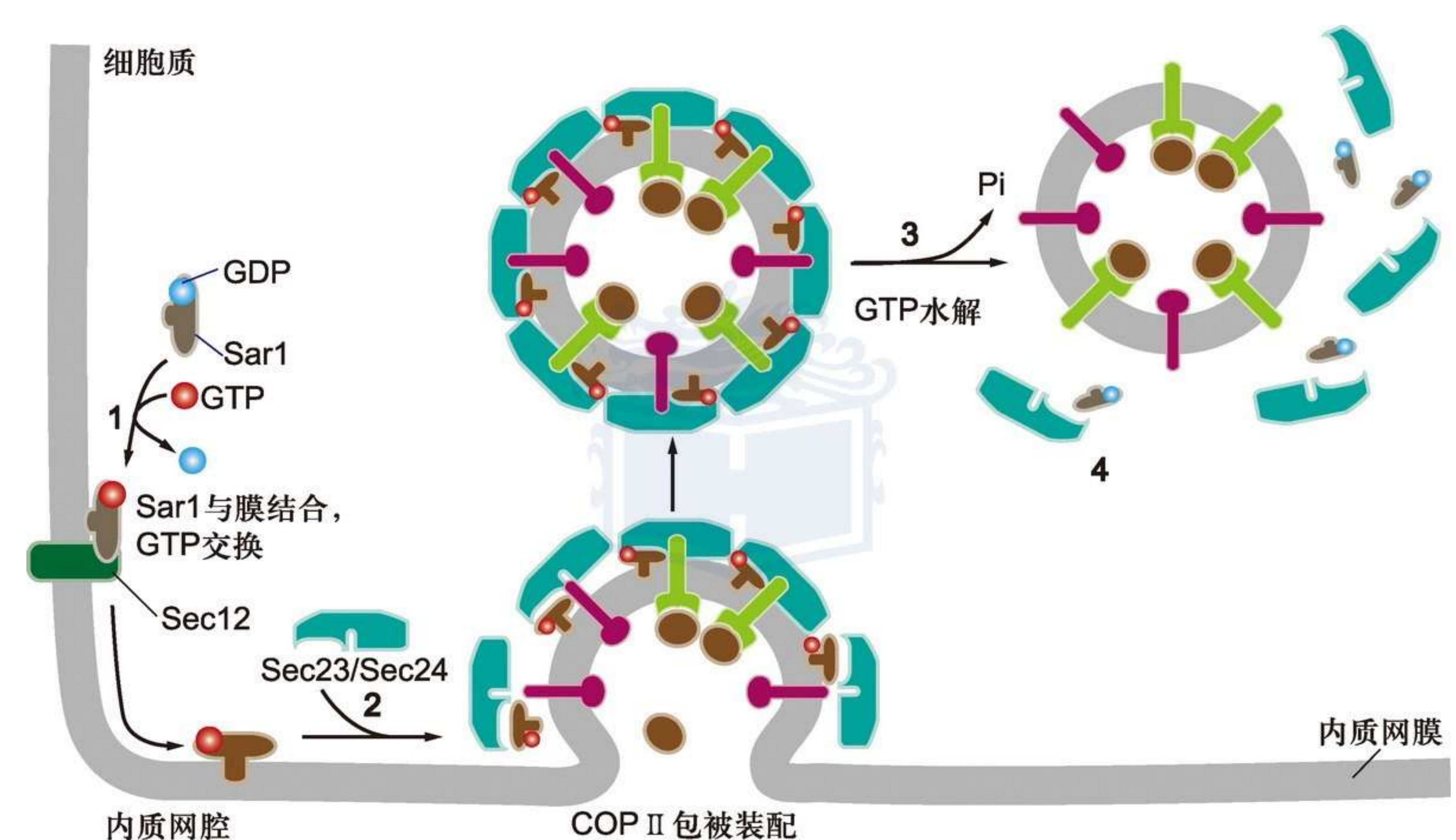


二、 COPII包被膜泡的装配与运输

➢**组成：由5种蛋白亚基组成，**小分子GTP结合蛋白Sar1、Sec23/24复合物、Sec13/Sec31复合物及大的纤维蛋白Sec16。**包被蛋白的装配是受控的。**



➢**特点：** COPⅡ包被膜泡是通过胞质可溶性COPⅡ包被蛋白在供体膜（ER膜）出芽聚合形成的，**具有对转运物质的选择性并使之浓缩。**Sar1-GTP与内质网膜结合，起始COPII亚基的装配，形成小泡的包被出芽，跨膜受体在腔面捕获并富集被转运的可溶性蛋白 。



膜泡转运的包装特异性取决于被转运蛋白的靶向分选序列，借以区分哪些膜蛋白或可溶性蛋白将进一步包装转运，哪些将作为驻留蛋白而被排除在外，从而使COPⅡ膜泡包被直接选择靶向序列或分选信号。

表 8-4 已知的指导蛋白质包装到特异性转运膜泡的分选信号

信号序列	具有信号的蛋白	信号受体	转运膜泡类型
腔内分选信号			
Lys-Asp-Glu-Leu（KDEL）	ER-驻留可溶性蛋白	高尔基体顺面膜囊 KDEL 受体	COPⅠ
甘露糖-6-磷酸（M6P）	在高尔基体顺面膜囊加工后的可溶性溶酶体酶	高尔基体反面膜囊 M6P 受体	clathrin/AP1
	分泌的溶酶体	质膜上 M6P 受体	clathrin/AP2
膜蛋白分选信号			
Lys-Lys-X-X（KKXX）	ER-驻留膜蛋白	COPⅠ α和β亚基	COPⅠ
两个酸性氨基酸（如 Asp-X-Glu）	ER-转运膜蛋白	COPⅡ Sec24 亚基	COPⅡ
Asn-Pro-X-Tyr（NPXY）	质膜上 LDL 受体	AP2 复合物	clathrin/AP2
Tyr-X-X-Φ（YXXΦ）	高尔基体反面膜囊蛋白	AP1（μ1 亚基）	clathrin/AP1
	质膜膜蛋白	AP2（μ2 亚基）	clathrin/AP2
Leu-Leu（LL）	质膜膜蛋白	AP2 复合物	clathrin/AP2

X= 任意氨基酸；Φ = 疏水氨基酸。括号内为单字母氨基酸缩写。

三、 COP I 包被膜泡的装配与运输

- COP I 包被膜泡介导的**细胞内膜泡逆向运输**，负责从高尔基体反面膜囊到顺面膜囊以及从高尔基体顺面管网状区到内质网的膜泡转运，包括再循环的膜脂双层、内质网驻留的可溶性蛋白和膜蛋白（如v-SNARE），是内质网回收错误分选的逃逸蛋白返回内质网的重要途径。

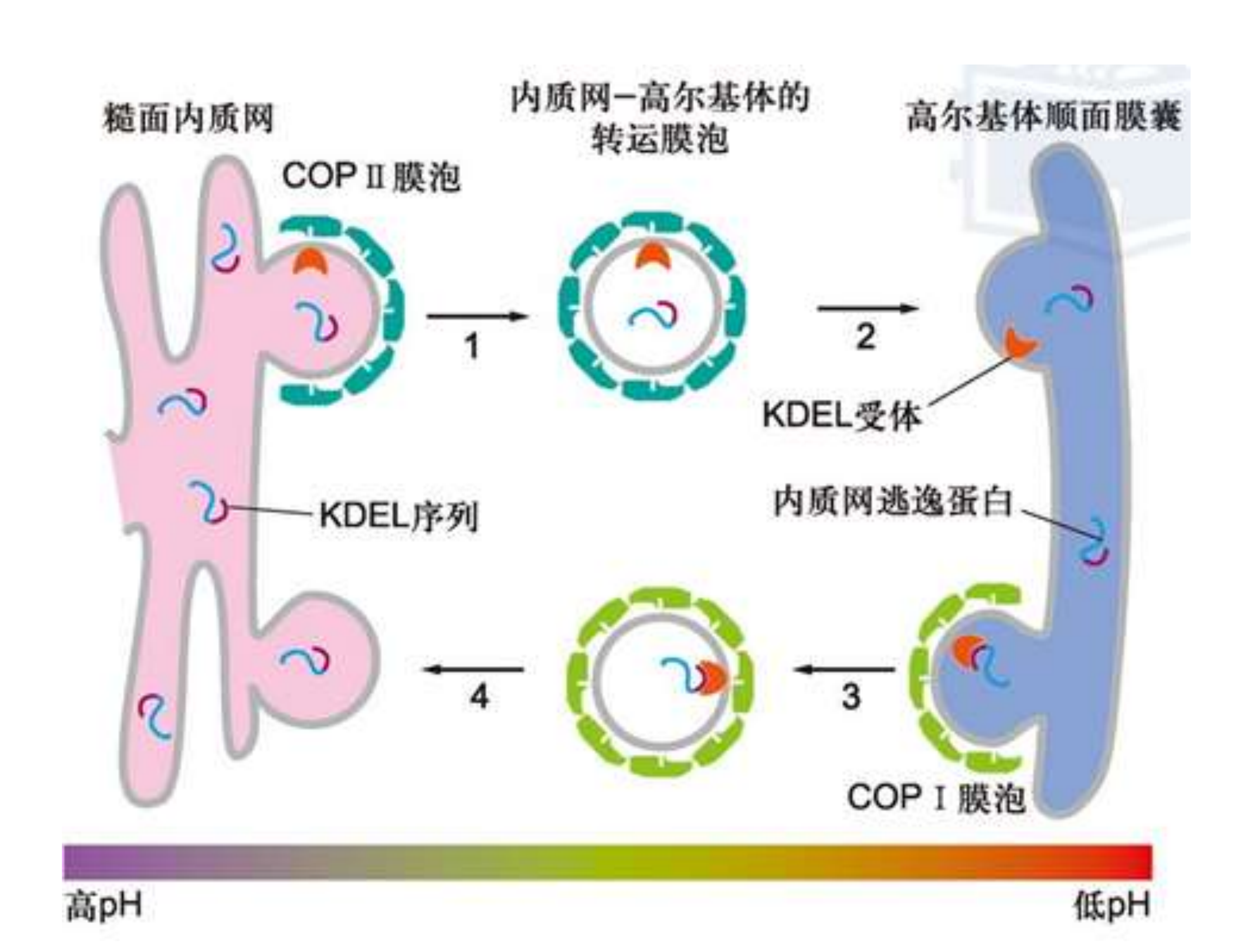
- COP I 包被**组成含有8种蛋白亚基，包被蛋白复合物的装配与去装配依赖于ARF(装配反应因子，GTP-binding protein)**，即一种调节膜泡转运的蛋白，有一个共价结合的疏水N端脂基团，帮助其插入ER膜，同膜结合的ARF对包被蛋白的进一步装配起募集者作用。

三、 COP I 包被膜泡的装配与运输

- 是什么因素决定一种特异蛋白是被保留在内质网还是进入高尔基体？已有研究证据显示，细胞器中的蛋白质是通过两种机制保留及回收来维持的：
- 一是转运膜泡将驻留蛋白有效排斥在外，例如，有些驻留蛋白参与形成大的复合物，因而不能被包装在出芽形成的转运膜泡中，结果被保留下来；
- 二是对逃逸蛋白的回收机制，使之返回它们正常驻留的部位。回收逃逸的内质网蛋白是通过回收信号介导的特异性受体完成的。现已发现，内质网的正常驻留蛋白，不管在腔内还是在膜上，它们在C端含有一段回收信号序列，如果它们意外地被包装进入转运膜泡从内质网逃逸到高尔基体CGN，则CGN区的膜结合受体蛋白将识别并结合这些逃逸蛋白的回收信号，形成COP I 包被膜泡将它们回收到内质网。

对逃逸蛋白的回收机制：

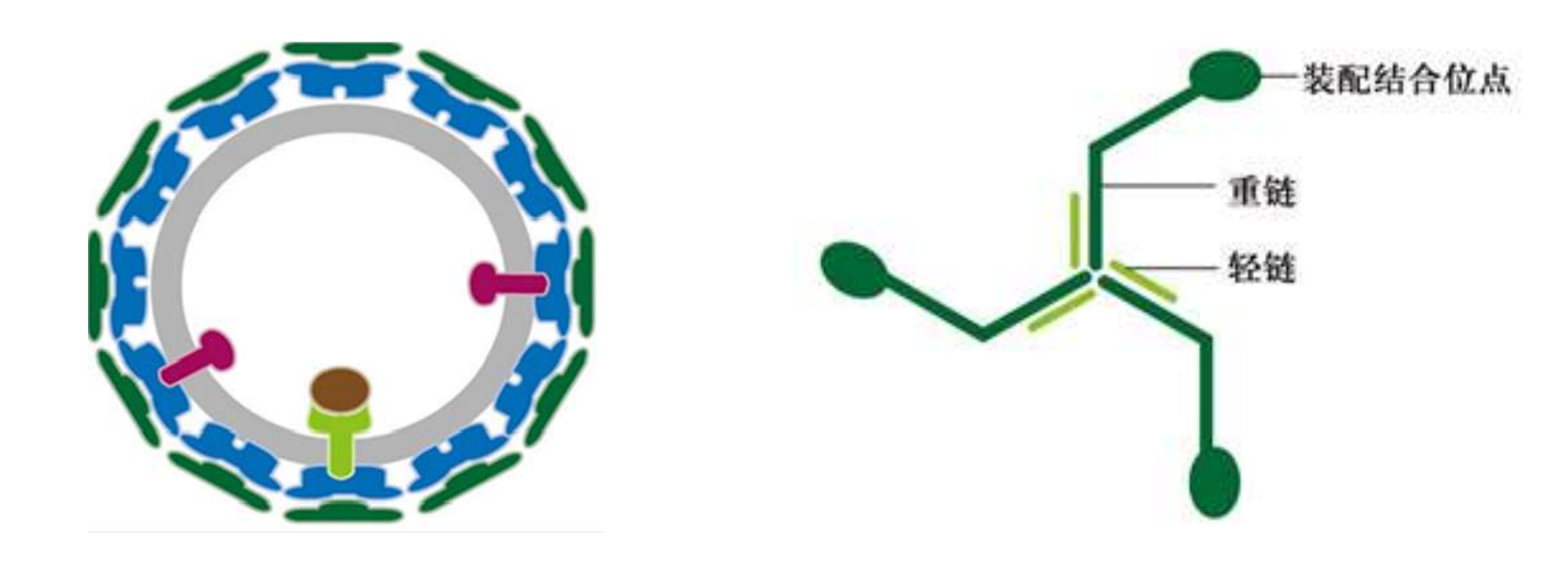
内质网的驻留蛋白，C基端含有一段回收信号序列。CGN区的膜结合受体蛋白将识别这些逃逸蛋白的回收信号，形成COP I 包被膜泡将它们回收到内质网。



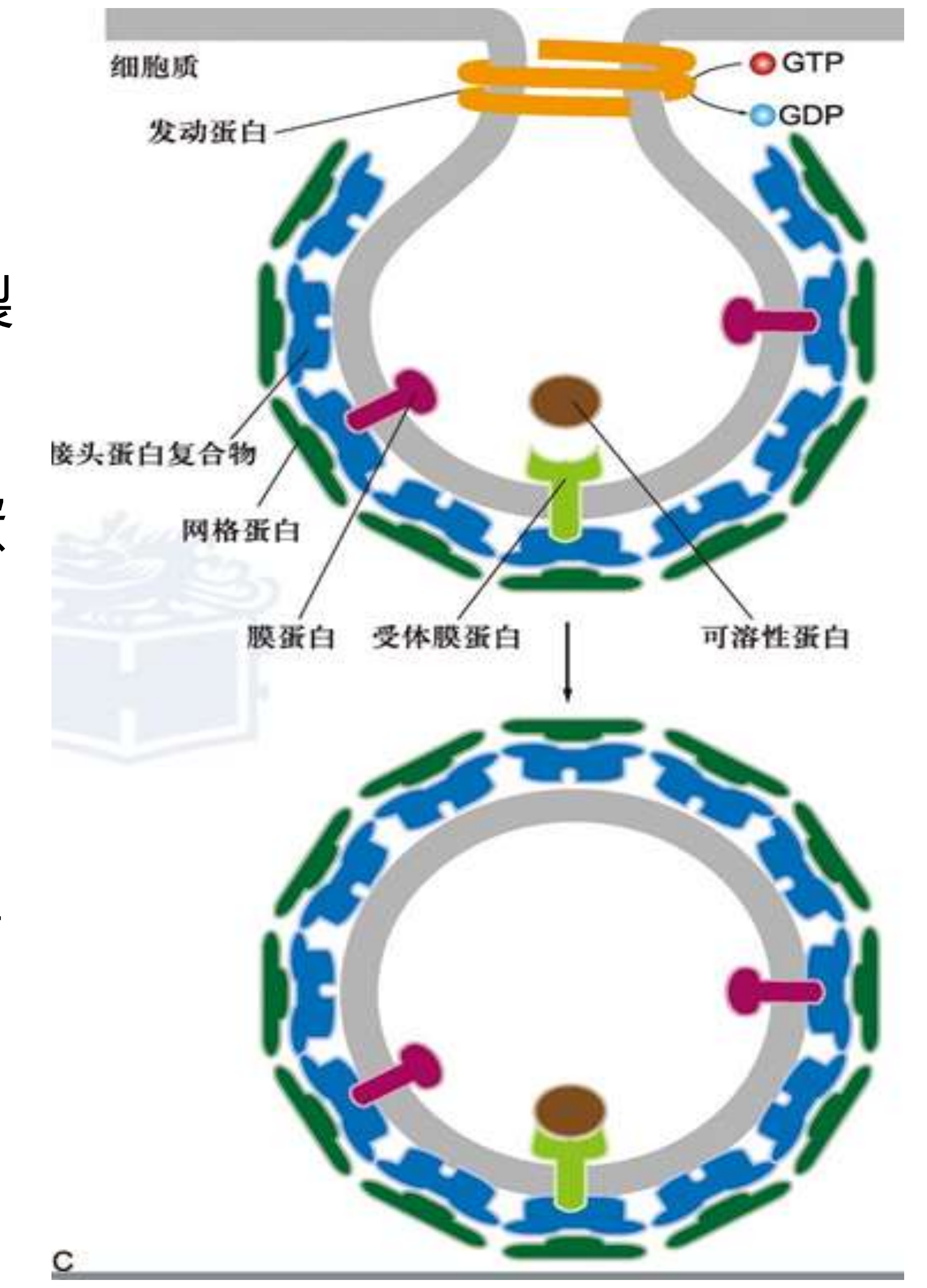
四、网格蛋白 / 接头蛋白（衔接蛋白）包被膜泡的装配与运输

- 网格蛋白/接头蛋白包被膜泡**介导**蛋白质从高尔基体TGN向胞内体、溶酶体、分泌泡和植物细胞液泡的运输，也参与质膜受体介导的胞吞作用中从细胞表面运往胞内体转而到溶酶体的运输。**网格蛋白有被小泡形成的发源地是高尔基体TGN和质膜。**

- **网格蛋白**呈三腿结构，也有自组装形成多角型网格的特性。



- 网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成的首要步骤是供体膜出芽和包被的装配，芽体缢缩并与供体膜断裂是网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成的关键。
- 发动蛋白具有GTPase活性，介导网格蛋白/接头蛋白包被膜泡的缢缩并与供体膜断裂。
- 网格蛋白/接头蛋白包被膜泡形成后不久便脱去包被，网格蛋白/接头蛋白包被的解聚一方面涉及ARF开关蛋白（装配反应因子）从结合GTP状态转变为结合GDP状态，也涉及ATP水解提供的能量。

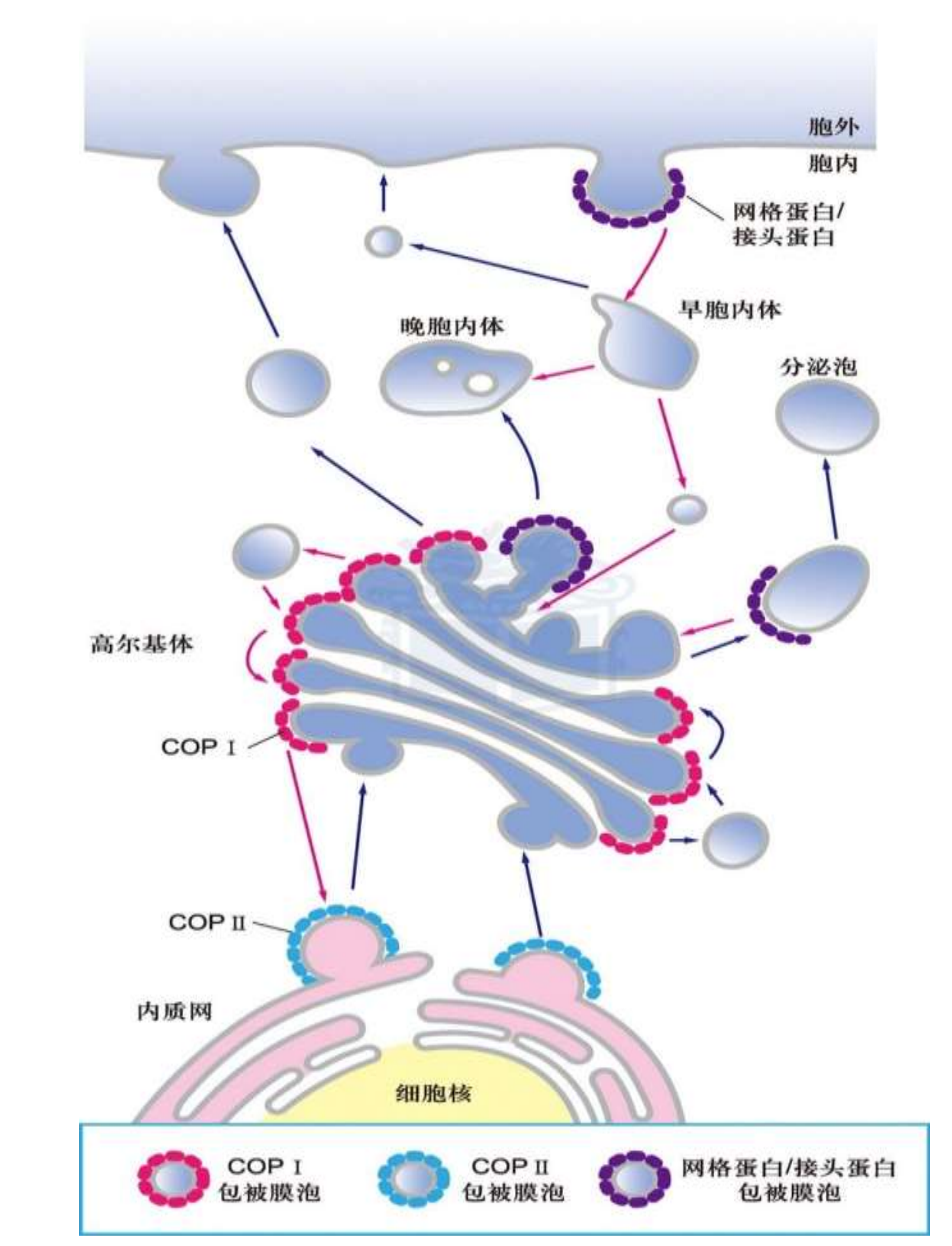


3种不同的主要膜泡运转途径

1、COPⅡ包被膜泡介导**顺向运输**，即从rER到高尔基体顺面网状结构

2、COP Ⅰ包被膜泡介导**逆向运输**，即在高尔基体内膜囊间和从高尔基体顺面膜囊和高尔基体顺面网状结构到rER

3、网格蛋白/接头蛋白包被膜泡从**高尔基体反面管网区出芽**和从**质膜内化**形成，脱包被后与晚期胞内体融合，此类膜泡的包被除网格蛋白外还有其他蛋白。



五、转运膜泡与靶膜的锚定和融合

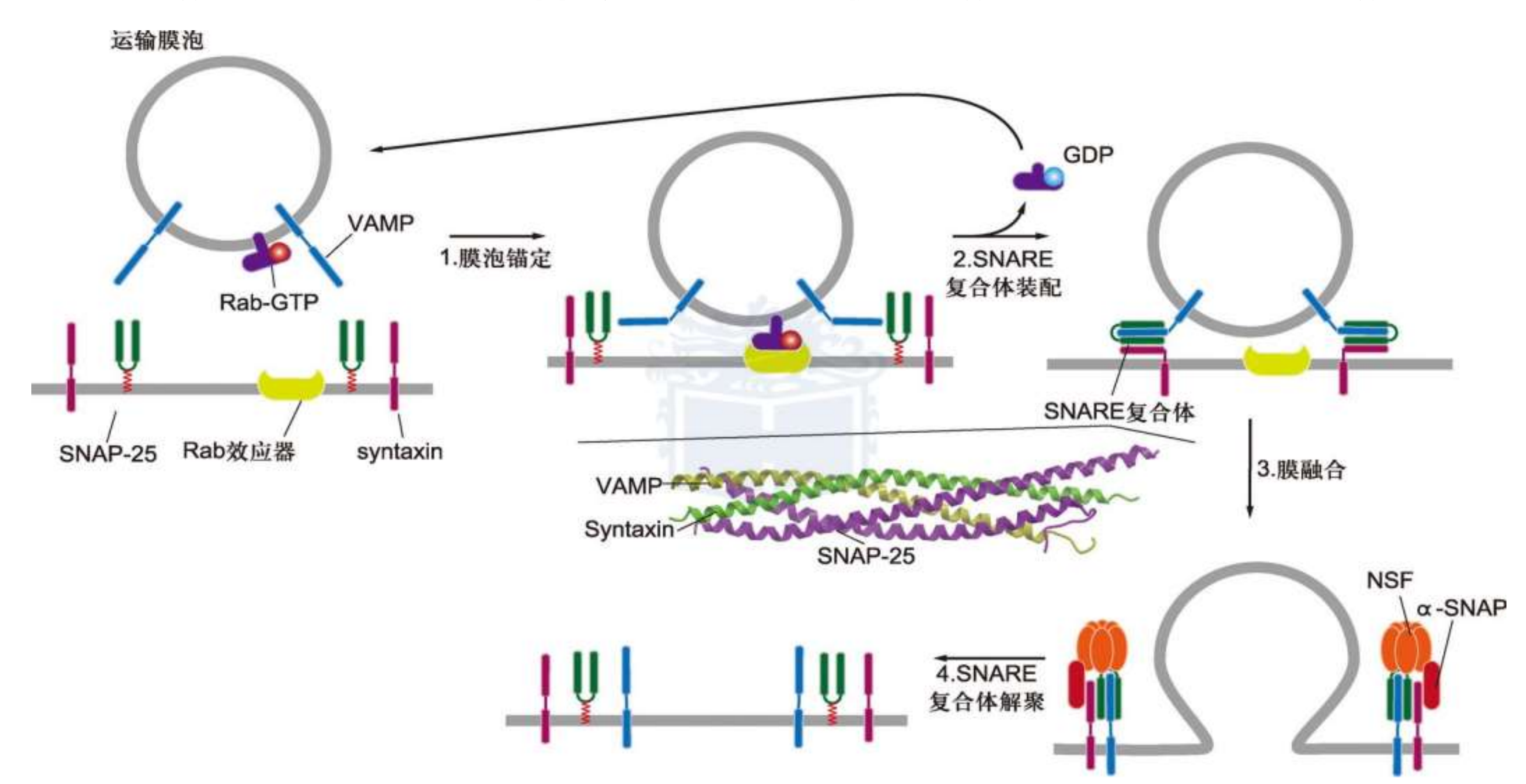
- 膜泡转运是十分复杂的过程，在酵母基因组中至少发现25种以上与膜泡转运有关的基因。
- 膜泡运输的关键步骤至少涉及如下过程：

①供体膜的出芽、装配和断裂，形成不同的包被转运膜泡，该过程已在前面述及；

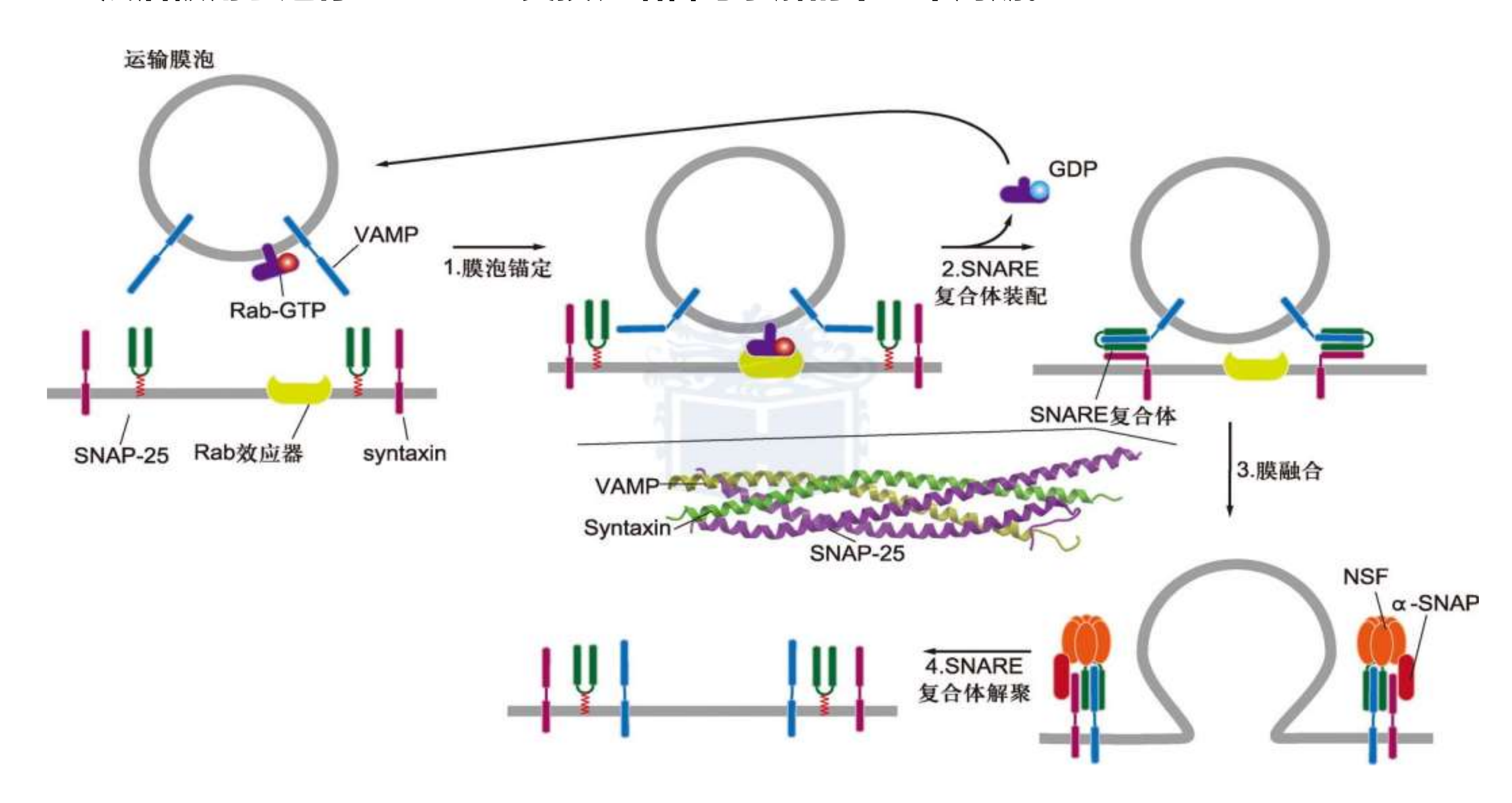
②在细胞内由马达蛋白驱动、以微管为轨道的膜泡运输；

③转运膜泡与特定靶膜的锚定和融合。

- 在膜泡靶向转运过程中，有另一类小分子GTP 结合蛋白，即 Rab 蛋白的参与。
- 和 Sarl 与 ARF 蛋白一样， Rab 蛋白也属于开关调控蛋白GTP酶超家族成员，在特异性鸟苷酸交换因子 (GEF) 催化下，胞质中Rab-GDP 转换为 Rab-GTP, 引发 Rab 构象改变，致使其与特定转运膜泡的表面蛋白相互作用，并通过类异戊二烯基团插入转运膜泡内。 Rab-GTP 被结合在膜泡表面，与靶膜上Rab效应器的结合蛋白相互作用，使转运膜泡被锚定在适当的靶膜上。

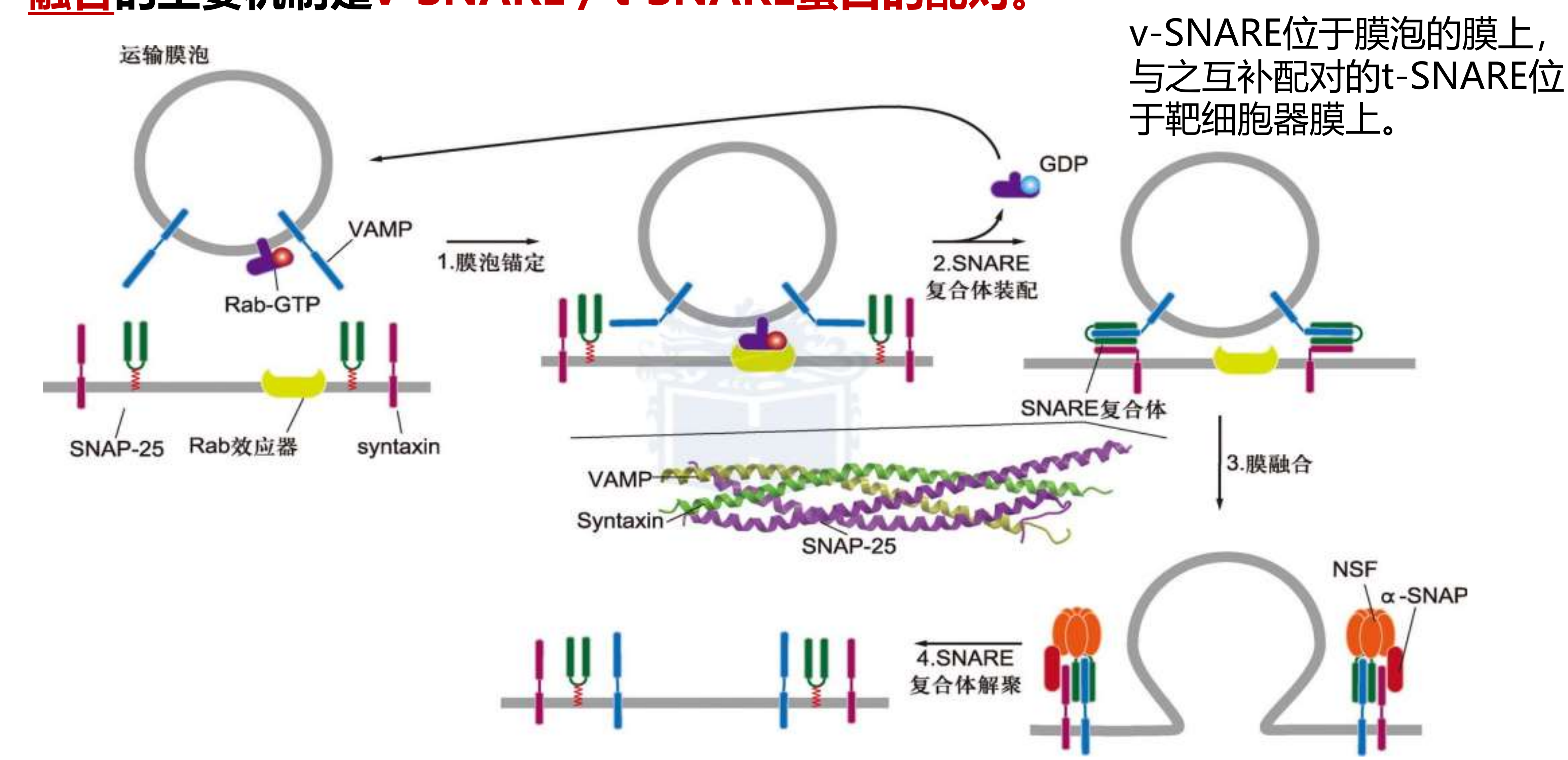


- **膜泡融合发生以后，与Rab-蛋白结合的GTP被水解成GDP，随即引发Rab-GDP释放，然后被用于进行GDP-GTP交换、结合与水解的下一个周期。**



➢ **膜泡锚定与融合是一个耗能的特异性过程**，其特异性是通过供体膜和靶膜上的蛋白相互作用完成的。**Rab蛋白主要是控制转运膜泡与适当靶膜的锚定，介导融合的主要机制是v-SNARE / t-SNARE蛋白的配对。**

v-SNARE位于膜泡的膜上，与之互补配对的t-SNARE位于靶细胞器膜上。



本章概要

1、真核细胞中除线粒体和植物细胞叶绿体中能合成少量蛋白质外，绝大多数蛋白质都是由核基因编码，起始合成均发生在游离核糖体上，然后或在细胞质基质（游离核糖体）中完成翻译过程，或在粗面内质网膜结合核糖体上完成合成。然而，蛋白质发挥结构或功能作用的部位几乎遍布细胞的各种区间或组分。因此必然存在不同的机制以确保蛋白质分选，转运至细胞的特定部位，也只有蛋白质各就各位并组装成结构与功能的复合体，才能参与实现细胞的各种生命活动。

本章概要

2、信号肽学说是解释分泌性蛋白在糙面内质网上合成的重要理论，该过程是包括蛋白质N端的信号肽、信号识别颗粒和内质网膜上信号识别颗粒的受体等因子共同协助完成的。

3、蛋白质分选包括蛋白质的跨膜转运、门控转运和膜泡运输等主要的转运方式。其分选指令存在于多肽链自身，继信号假说提出与确证后，人们又发现一系列的信号序列，指导蛋白的靶向转运。

本章概要

4、细胞内膜泡运输的研究进展较大，包括COPⅡ包被膜泡介导的细胞内顺向运输，即负责从内质网到高尔基体的物质运输；COPⅠ包被膜泡介导的细胞内膜泡逆向运输，负责从cis高尔基体网状区到内质网膜泡转运，包括某些蛋白质如v-SNARE和回收错误分选的内质网逃逸蛋白返回内质网；网格蛋白/AP包被膜泡介导的蛋白质从高尔基体TGN向质膜、胞内体或溶酶体以及分泌泡的运输，也参与受体介导的细胞内吞作用。

5、包被膜泡的组装、转运及其与靶膜的融合是一个特异性的、需能的过程，膜泡锚定与融合的特异性是通过供体膜和靶膜上的蛋白相互作用完成的。